
Wechselwirkungen des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus
Saccharomyces cerevisiae mit seinen Substraten Cytochrom *c* und
Ubichinon sowie mit Membranlipiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Lange
aus Winterberg

Frankfurt am Main 2001
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W.E. Müller
1. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Michel

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Atmungskette	3
2.2 Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran	5
2.3 Der Cytochrom- bc_1 -Komplex	6
2.3.1 Der Aufbau des Cytochrom- bc_1 -Komplexes	6
2.3.2 Der Q-Zyklus als Mechanismus des Cytochrom- bc_1 -Komplexes	8
2.3.3 Die Elektronenübertragung mittels Cytochrom c	10
2.3.4 Die Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes	12
2.4 Zielsetzung	13
3 Ergebnisse	15
3.1 Untersuchung der am Cytochrom- bc_1 -Komplex gebundenen Phospholipide	15
3.1.1 Lokalisation der Transmembranregion im Cytochrom- bc_1 -Komplex	15
3.1.2 Protein-Protein-Interaktionen im Cytochrom- bc_1 -Komplex	17
3.1.2.1 Interaktionen innerhalb eines Monomers	
3.1.2.2 Interaktionen zwischen den beiden Monomeren im Cytochrom- bc_1 -Komplex	19
3.1.3 Analyse von Phospholipiden im Cytochrom- bc_1 -Komplex	20
3.1.3.1 Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie	20
3.1.3.2 Analyse von Phospholipiden mittels ESI-Massenspektrometrie	23
3.1.3.2.1 Identifizierung der Phospholipide mittels Tandem-ESI-Massenspektrometrie	23
3.1.3.2.2 Analyse von Phospholipiden in Proteinproben aus der Proteinreinigung mittels ESI-Massenspektrometrie	26
3.1.3.2.3 Analyse von Phospholipiden in Kristallen des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mittels ESI-Massenspektrometrie	28

3.1.4 Identifizierung der gebundenen Phospholipide in der Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes	30
3.1.4.1 Phospholipidbindung in der Region I	32
3.1.4.2 Phospholipidbindung in der Region II	34
3.1.4.3 Phospholipidbindung in der Region III	35
3.1.5 Der Cytochrom- bc_1 -Komplex in der Cardiolipin defizienten <i>S. cerevisiae</i> -Mutante <i>crd1</i>	37
3.1.5.1 Bestimmung des Cytochrom- bc_1 -Komplexes in Gesamtmembranen aus der <i>crd1</i> -Mutante	37
3.1.5.2 Untersuchung des isolierten Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus der <i>crd1</i> -Mutante	38
3.1.6 Untersuchung der gebundenen Phospholipide mittels ^{31}P -Festkörper-NMR Spektroskopie	40
3.2 Bestimmung der Struktur des Redoxkomplexes aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom <i>c</i>	42
3.2.1 Kokristallisation des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit Cytochrom <i>c</i>	43
3.2.1.1 Auswahl der Ionenstärke für die Kokristallisation	43
3.2.1.2 Auswahl des pH-Wertes für die Kokristallisation	46
3.2.2 Kristallographische Daten der Kokristallisationsansätze mit Cytochrom <i>c</i>	46
3.2.2.1 Strukturlösung durch molekularen Ersatz	47
3.2.2.2 Verfeinerung der Strukturen	47
3.2.3 Die Struktur des Redoxkomplexes aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom <i>c</i>	48
3.2.3.1 Verfeinerung der Struktur	48
3.2.3.2 Kristallpackung	49
3.2.3.3 Orientierung der Häm-Gruppen von Cytochrom c_1 und Cytochrom <i>c</i>	50
3.2.3.4 Intermolekulare Wechselwirkungen im Komplex	51
3.2.3.5 Eigenschaften der Interaktionsfläche zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom <i>c</i>	52
3.2.3.6 Strukturelle Unterschiede der beiden Monomere im Enzymdimer	54
3.2.3.7 Bindung des Cytochrom <i>c</i> an den homodimeren	

Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex	54
3.2.3.8 Strukturunterschiede an der Ubichinon- Reduktionsstelle (Q _i -Bindungsstelle)	55
3.2.3.9 Kinetik des Elektronentransfers zwischen Cytochrom <i>c</i> ₁ und Cytochrom <i>c</i>	56
3.2.3.10 Kinetik des Elektronentransfers im Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex	57
3.3 Erzeugung und Untersuchung des Ubisemichinons an der Q _i -Bindungsstelle	58
 4 Diskussion	 62
4.1 Analyse der Phospholipide im Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex	62
4.2 Gebundene Phospholipide in der Struktur des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	63
4.2.1 Das "interhelikale" Phosphatidylinosit	65
4.2.2 Die Bindungsstelle für Cardiolipin	66
4.2.3 Mögliche Funktion des gebundenen Cardiolipins bei der Protonierung während der Ubichinonreduktion	67
4.3 Funktionelle Implikationen aus der Struktur des Komplexes mit gebundenem Cytochrom <i>c</i>	69
4.3.1 Die Eigenschaften der Cytochrom- <i>c</i> -Bindungsstelle	69
4.3.2 Die Kinetik der Cytochrom- <i>c</i> -Reduktion	70
4.3.3 Die Kontrolle der Cytochrom- <i>c</i> -Reduktion	71
4.3.4 Konformationsunterschiede durch Komplexbildung	72
4.3.5 Die Rolle des "Hinge"-Proteins bei der Bindung des Cytochrom <i>c</i>	73
4.3.6 Die Stöchiometrie der Cytochrom- <i>c</i> -Bindung	74
4.3.7 Mögliche Koordinierung der Cytochrom- <i>c</i> -Bindungsstelle mit der Q _i -Bindungsstelle	75
4.3.8 Übertragbarkeit der Interaktion des Cytochrom <i>c</i> mit dem Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex auf dessen Interaktion mit der Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase und anderen Komplexpartnern	75
4.4 Eigenschaften des Ubisemichinons an der Q _i -Bindungsstelle	76

5 Material und Methoden	78
5.1 Material	78
5.1.1 Biologisches Material	78
5.1.2 Chemikalien	78
5.1.3 Proteine	79
5.1.4 Säulenmaterial	79
5.1.5 Lösungen	79
5.2 Methoden	81
5.2.1 Proteinchemische Methoden	81
5.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	81
5.2.1.2 Ultrafiltration von Proteinproben zur Erhöhung der Proteinkonzentration	82
5.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	82
5.2.1.4. Aufschluss der Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Präparation von Gesamtmembranen	83
5.2.1.5 Solubilisierung des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	83
5.2.1.6 Reinigung des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	84
5.2.1.7 Präparative Gelfiltration des Komplexes, bestehend aus Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex und Fv-Fragment 18E11	84
5.2.1.8 Derivatisierung des Cytochroms c (Isoform 1) von <i>S. cerevisiae</i> am Cystein102	85
5.2.1.9 Messung der Enzymaktivität des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplexes	86
5.2.1.10 Erzeugung des proteingebundenen Semichinonradikals	86
5.2.2 Analyse der gebundenen Phospholipide im Cytochrom- <i>bc</i> ₁ -Komplex	87
5.2.2.1 Extraktion der Phospholipide aus den Membranproteinproben	87
5.2.2.2 Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie	88
5.2.2.3 Analyse der Phospholipide mittels ESI-Massenspektrometrie	88
5.2.2.4 Identifizierung der Phospholipide anhand ihrer charakteristischen Fragmentierungen mittels Tandem- Massenspektrometrie	92
5.2.3 Proteinkristallographische Methoden	92
5.2.3.1 Proteinkristallisation	92

5.2.3.1.1 Kristallisation des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
5.2.3.1.2 Kokristallisation des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit Cytochrom <i>c</i>	93
5.2.3.3 Strukturlösung durch molekularen Ersatz	94
5.2.3.4 Verfeinerung von Proteinstrukturen	94
5.2.3.5 Berechnung von Elektronendichtekarten	95
5.2.3.6 Berechnung von Oberflächen in Proteinkomplexen	95
5.2.3.7 Graphische Darstellung von Proteinoberflächen	95
5.2.3.8 Erstellung von Aminosäuresequenzvergleichen	95
5.2.3.9 Berechnung von Elektronentransfer-Raten aus Strukturdaten	96

6 Literatur

97

Anhang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BCA	Bicinchoninsäure, <i>bicinchoninic acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumine</i>
CL	Cardiolipin, 1,3-Bisphosphatidyl-glycerin
COB	Cytochrom <i>b</i> aus <i>S. cerevisiae</i>
COR1	Core-Protein 1 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
CYT1	Cytochrom <i>c</i> ₁ aus <i>S. cerevisiae</i>
D ₂ O	Deuteriumoxid, schweres Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENDOR	Elektronen-Kern-Doppelresonanz, <i>electron nuclear double resonance</i>
Engl.	englisch
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz, <i>electron paramagnetic resonance</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation, <i>electrospray ionization</i>
FF	Fast Flow
Fv	Antikörperfragment aus variablen Domänen
h	Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethylsulfonat)
kDa	Kilodalton
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
M	molar, Stoffmengenkonzentration
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PI	Phosphatidylinosit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Ubichinon
QCR10	Untereinheit 10 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
QCR2	Core-Protein 2 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
QCR6	Untereinheit 6 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
QCR7	Untereinheit 7 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
QCR8	Untereinheit 8 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>
QCR9	Untereinheit 9 des Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>

RIP1	Rieske Eisen-Schwefel-Protein aus <i>S. cerevisiae</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat, sodiumdodecylsulphate
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)9-aminomethan
UM	n-Undecyl- β -D-maltosid
UZ	Ultrazentrifuge
v:v	Volumenprozent
w:v	Massenkonzentration
w:w	Massenprozent
xg	Vielfache der Schwerebeschleunigung
[M+Cl] ⁻	Molekül-Ion durch Anlagerung eines Chlorid-Ions
[M+H] ⁺	Molekül-Ion durch Anlagerung eines Protons
[M+Na] ⁺	Molekül-Ion durch Anlagerung eines Natrium-Ions
[M-2H] ²⁻	Molekül-Ion durch Dissoziation zweier Protonen
[M-H] ⁻	Molekül-Ion durch Dissoziation eines Protons

1 Zusammenfassung

Der Cytochrom- bc_1 -Komplex katalysiert die Elektronenübertragung von Ubihydrochinon auf Cytochrom c in der Atmungskette und in der bakteriellen Photosynthese. Das Enzym stellt somit das Bindeglied zwischen den Ubihydrochinon bildenden Dehydrogenasen und der Cytochrom c oxidierenden Cytochrom- c -Oxidase dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* mit seinen Substraten Ubichinon und Cytochrom c sowie mit Phospholipiden der inneren Mitochondrienmembran untersucht.

Durch Analyse von Gesamtlipidextrakten aus Proben des Cytochrom- bc_1 -Komplexes konnte gezeigt werden, daß das Enzym in Anwesenheit von vier verschiedenen Phospholipiden gereinigt und kristallisiert werden kann. In der Kristallstruktur des Enzyms bei 2,3 Å Auflösung wurden fünf Bindungsstellen für Phospholipide und eine Bindungsstelle für ein Detergensmolekül identifiziert. Die Bindungsstelle für eines der Phospholipide, ein Cardiolipin-Molekül, liegt am Eingang eines von zwei Protonierungspfaden für die Ubichinon-Reduktionsstelle (Q_i -Bindungsstelle). Ein Phosphatidylinosit-Molekül befindet sich in einer außergewöhnlichen Position unweit der flexiblen "Linker"-Region des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins und trägt vermutlich zur Stabilisierung dieser katalytischen Untereinheit bei.

Durch Röntgenbeugung an Kokristallen bestehend aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und gebundenem Cytochrom c konnte die dreidimensionale Struktur dieses transienten Enzym-Substrat-Komplexes bei 2,97 Å ermittelt werden. Die Kristallstruktur ist die erste Struktur des Cytochrom c im Komplex mit einem seiner beiden Redoxpartner aus der Atmungskette. Sie zeigt, daß das Cytochrom c hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Cytochrom c_1 bindet und daß die Nähe der beiden c -Typ Hämgruppen eine schnelle Reduktion des Cytochrom c erlaubt. Im homodimeren Cytochrom- bc_1 -Komplex ist nur eine der beiden Bindungsstellen für Cytochrom c besetzt. Diese hälftige Substratbindung zeigte sich auch für das Ubichinon in der Q_i -Bindungsstelle und weist darauf hin, daß die beiden Monomere des Enzyms unabhängig voneinander oder sequentiell arbeiten können. Möglicherweise dient dies der Regulation der Enzymaktivität des Cytochrom- bc_1 -Komplexes.

Durch partielle Reduktion des Cytochrom- bc_1 -Komplexes in Anwesenheit von Ubichinon konnte ein proteingebundenes Ubisemichinonradikal erzeugt und durch Schockgefrieren stabilisiert werden. Die spektralen Eigenschaften dieses Radikals sind typisch für ein Ubisemichinon an der Q_i -Bindungsstelle. Durch Spektroskopie an einer Probe, die einem Wasserstoff/Deuterium-Austausch unterzogen wurde, konnte gezeigt werden, daß dieses Radikal von Protonen koordiniert wird, die mit dem Solvens im Austausch stehen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Theorie des Q-Zyklus und wurde durch die hochauflösenden Kristallstruktur des Enzyms bei 2,3 Å vorhergesagt.

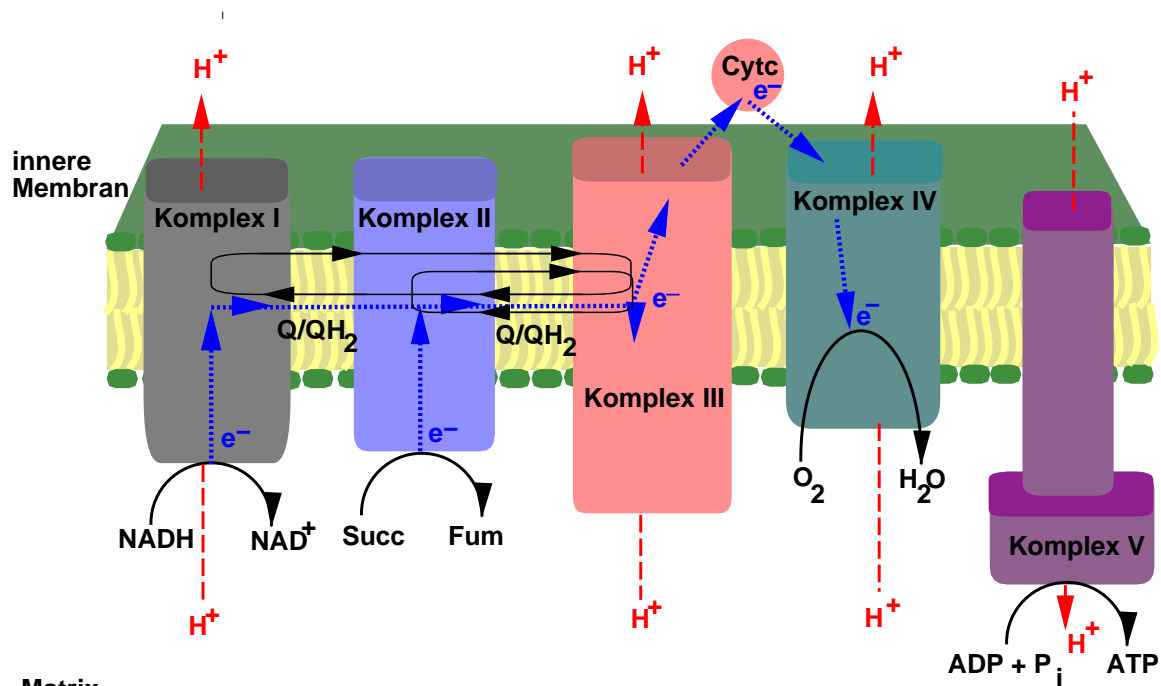
Die erzielten Ergebnisse zeigen neue Informationen zum Wechselspiel des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit Phospholipiden aus der inneren Mitochondrienmembran. Die Bestimmung der Struktur des transienten Komplexes bestehend aus Enzym und Cytochrom c erweitert das Bild über den Elektronentransfer durch Cytochrom c zwischen dem Cytochrom- bc_1 -Komplex und der Cytochrom- c -Oxidase. Das mögliche Zusammenwirken der Bindungsstellen für Cytochrom c und Ubichinon ist ein neuer mechanistischer Aspekt, der auf eine Regulation der Enzymaktivität schließen läßt.

2 Einleitung

2.1 Die Atmungskette

Eine universelle Art der Energiekonservierung in Lebewesen ist der Aufbau von elektrochemischen Protonengradienten an Phospholipiddoppelschichten (Biomembranen). Der elektrochemische Protonengradient treibt die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i), katalysiert durch die ATP-Synthase, sowie den Transport von Metaboliten an. Der Gesamtvorgang wird daher auch als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Die Hydrolyse von ATP ist für den Ablauf vieler endergonischer Stoffwechselprozesse nötig.

Intermembranraum



Matrix

Abb.1: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran. Die Oxidation von $NADH$ zu NAD^+ durch Komplex I und von Succinat (Succ) zu Fumarat (Fum) durch Komplex II generiert Ubichinol, das durch den Komplex III oxidiert wird. Das durch Komplex III reduzierte Cytochrom *c* (Cyt*c*) wird durch Komplex IV oxidiert und Sauerstoff wird zu Wasser reduziert. Komplex V nutzt den aufgebauten elektrochemischen Protonengradienten zur Synthese von ATP.

In der Zelle werden bei der Oxidation von Nährstoffen die Elektronenüberträger NAD^+ und FAD reduziert. Die Übertragung von Elektronen von NADH und FADH_2 auf molekularen Sauerstoff (O_2) geschieht in der Atmungskette (siehe Abb.1). Eine Kette von membranständigen Enzymkomplexen koppelt diesen Elektronenübertrag an eine Translokation von Protonen über die Phospholipidmembran. Die fünf Enzymkomplexe der Atmungskette werden nach ihren Substraten auch NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), Ubihydrochinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III), Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) und ATP-Synthase (Komplex V) benannt (Hatefi, 1985; Saraste, 1999). Die Enzyme der Atmungskette und ihre Substrate sind evolutionär sehr alt (Berry *et al.*, 2000; Castresana *et al.*, 1995; Castresana & Saraste, 1995).

In *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Organismen ist kein membranständiger Komplex I vorhanden (Josef-Horne *et al.*, 2001). Den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon katalysieren hier alternative membranperiphere Oxidoreduktasen.

Im Kontext des supramolekularen Aufbaus der Atmungskette werden zwei Modelle diskutiert (Rich, 1984). Nach dem Modell des flüssigen Zustands (liquid state model) können die einzelnen Enzymkomplexe (I-V) in der Lipidmembran unabhängig voneinander lateral diffundieren. Im Gegensatz dazu beschreibt das Modell des festen Zustands (solid state model) die Atmungskette als supramolekulare Assoziation der Enzymkomplexe (I-V). Die Isolierung der Enzymkomplexe der Atmungskette lieferte Hinweise auf eine supramolekulare Assoziation der Komplexe I und III (Hatefi & Rieske, 1967) sowie eine Assoziation der Komplexe II und III (Tisdale, 1967; Bruel *et al.*, 1996) und der Komplexe III und IV (Cruciat *et al.*, 2000). Die alternativen NADH-Oxidoreduktasen in *S. cerevisiae* scheinen mit dem Komplex III zu interagieren (Grandier-Vazeille *et al.* 2001). Durch elektrophoretische Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß sowohl in Mitochondrien aus Säugetieren als auch aus *S. cerevisiae* die Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung sogenannte Superkomplexe bilden (Schägger & Pfeiffer, 2000; Schägger & Pfeiffer, 2001). Kinetische Untersuchungen haben darüberhinaus gezeigt, daß in *S. cerevisiae* die Atmungskette eine funktionelle Einheit bildet mit der die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom *c* direkt verbunden sind (Boumans *et al.*, 1998).

2.2 Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran

Die Enzyme der Atmungskette befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran, die eine Biomembran mit sehr hohem Protein/Phospholipid-Verhältnis ist (Daum, 1985). In *Saccharomyces cerevisiae* sind die Hauptlipidkomponenten Phosphatidylcholin (38%) und Phosphatidylethanolamin (24%) gefolgt von Phosphatidylinosit (16%) und Cardiolipin (16%) und Phosphatidylserin (4%) sowie Phosphatidsäure (2%) (Daum, 1985; Zinser *et al.*, 1998).

Cardiolipin ist ein charakteristisches Phospholipid von Membranen des Energiestoffwechsels (Hoch, 1992) und kommt in Eukaryonten ausschließlich in Mitochondrien vor, wo es hauptsächlich in der inneren Membran zu finden ist (Daum, 1985). Durch seine vier Fettsäureketten und die negativ geladenen Phosphodiestergruppen kann Cardiolipin an Proteine gebunden vorkommen (Hoch, 1992). Eine Bindung des Lipids konnte sowohl für vier der fünf Proteinkomplexe aus der Atmungskette (Komplexe I, III, IV und V) nachgewiesen werden als auch für Proteine aus dem Intermembranraum (Beyer & Nüscher, 1996; Dowhan, 1997; Schlame *et al.*, 2000). Für drei der fünf Enzymkomplexe (Komplexe I, III und IV) konnte festgestellt werden, daß deren Enzymaktivität entscheidend von der Menge an gebundenem Cardiolipin abhängt (Fry & Green, 1981; Robinson, 1990; Yu & Yu, 1980). Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung der Enzymaktivität des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus Rind (*Bos taurus*) durch Cardiolipin reversibel ist (Gomez Jr. & Robinson, 1999; Schägger *et al.*, 1990). Der Verdau von gebundenem Cardiolipin mittels Phospholipasen führt zu einer Deaktivierung des Enzyms, die nur durch Cardiolipin wieder voll hergestellt werden kann. Am Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Bindung des für die Ubichinon-Reduktionsstelle (Q_i-Bindungsstelle) spezifischen Hemmstoffes Antimycin A entscheidend von der Anwesenheit des Cardiolipins abhängt (T'sai & Palmer, 1985). Der Mechanismus der Erhöhung der Enzymaktivität durch Cardiolipin ist bisher nicht bekannt. Die Methode der Röntgenbeugung an Membranprotein-Kristallen bietet die Möglichkeit die Funktion diese Membranlipids im

Energiestoffwechsel zu verstehen (Fyfe *et al.*, 2001). Cardiolipin konnte in der Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert werden (McAuley *et al.*, 1999; Wakeham *et al.*, 2001). In der Struktur der Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Bos taurus* wurden gebundene Cardiolipin-Moleküle vermutet (Mitzushima *et al.*, 1999).

2.3 Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex

2.3.1 Aufbau des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes

Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex (Ubihydrochinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase, E.C. 1.2.2.10) ist ein membranständiger Enzymkomplex. Das Enzym koppelt den Elektronenübertrag von Ubihydrochinon (Ubichinol) auf Cytochrom *c* mit der Translokation von Protonen über die Phospholipiddoppelschicht (Membran). Er gehört zur Familie der Cytochrom-*bc*-Komplexe, die sowohl in der Zellatmung als auch in der Photosynthese zu finden sind (Schutz *et al.*, 2000). Der katalytische Teil des Enzyms besteht aus drei transmembranen Untereinheiten. Cytochrom *b* enthält zwei Hämgruppen vom *b* Typ, die nicht-kovalent an die Polypeptidkette gebunden sind. Die beiden Hämgruppen werden anhand ihres unterschiedlichen Redoxpotentials als Hochpotential Häm *b_H* und Niedrigpotential Häm *b_L* bezeichnet. Cytochrom *c*₁ besitzt ein kovalent gebundenes Häm vom *c*-Typ und gehört zur Cytochrom-*c*-Familie des Typ I. Das sogenannte Rieske-Protein hat ein kovalent, asymmetrisch ligandiertes, Eisen-Schwefel-Zentrum vom [2Fe2S] -Typ. Bakterielle Cytochrom-*bc*₁-Komplexe können ausschließlich aus diesen drei Untereinheiten bestehen. Cytochrom-*bc*₁-Komplexe in Mitochondrien besitzen noch zusätzliche Untereinheiten. So besitzt der Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *S. cerevisiae* noch sieben weitere Untereinheiten (siehe Tab.1). Die sogenannten "Core"-Proteine 1 und 2 bilden bei den mitochondrialen Enzymen die größten Untereinheiten. Strukturell haben die Core-Proteine Ähnlichkeit mit mitochondrialen prozessierenden Peptidasen (Brumme *et al.*, 1998; Hunte *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Weiterhin enthalten mitochondriale Cytochrom-*bc*₁-Komplexe ein saures Protein, das sog. "Hinge"-Protein, das für die Bindung des Cytochrom *c* an das Enzym wichtig ist (Kim & King,

1983; Kim *et al.* 1987; Schmitt & Trumpower, 1990; Nakai *et al.*, 1993). Untereinheit 7, die 14 kDa Untereinheit scheint beim Enzym aus *Bos taurus* für die Protonen/Elektronen-Stöchiometrie wichtig zu sein (Cocco *et al.*, 1991), während sie bei dem Enzym aus *S. cerevisiae* für den Zusammenbau des Komplexes wichtig ist (Malaney *et al.*, 1997). Die Funktion der Untereinheit 8 im Enzym aus *S. cerevisiae* ist die Stabilisierung des Enzyms (Boumans *et al.*, 1997) sowie die Interaktion mit der Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II) in der Atmungskette (Bruel *et al.*, 1996). Die Untereinheit 9 ist in *S. cerevisiae* wichtig für den Einbau des Eisen-Schwefel-Zentrums in das Rieske-Protein (Phillips *et al.*, 1993). Untereinheit 10 des Enzyms aus *S. cerevisiae* stabilisiert vermutlich das Rieske-Protein im Komplex (Brandt *et al.*, 1994; Cruciat *et al.*, 1999).

Tab. 1: Die Untereinheiten des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae*. Angegeben sind die Untereinheiten anhand der Namen ihrer Gene, mit ihren Molekularmassen (MW) in Kilodalton (kDa), ihren Kofaktoren sowie ihren Funktionen.

Untereinheit	MW (kDa)	Kofaktor	Funktion
COR1	47,4		Keine MPP-Aktivität
QCR2	38,7		Keine MPP-Aktivität
COB	43,6	Häm <i>b</i>	Katalytisch
CYT1	27,8	Häm <i>c</i> ₁	Katalytisch
RIP1	20,1	[2Fe-2S]	Katalytisch
QCR6	14,5		Cyt <i>c</i> -Bindung
QCR7	14,4		Assemblierung
QCR8	10,8		Assemblierung
QCR9	7,3		2Fe-2S-Insertion
QCR10	8,8		Rieske-Stabilisierung

Durch Bindungsstudien mit verschiedenen Hemmstoffen konnte gezeigt werden, daß das Enzym über zwei verschiedene Bindungsstellen für Ubichinon verfügt (Jagow von & Link, 1986). Die Bindungsstelle der Ubichinon-Oxidation (Q_o-Bindungsstelle) liegt nahe des Häm *b*_L, während die Bindungsstelle für die Ubichinon-Reduktion (Q_i-Bindungsstelle) in der Nähe zum Häm *b*_H liegt.

2.3.2 Der Q-Zyklus als Mechanismus des Cytochrom- bc_1 -Komplexes

Der Mechanismus des Cytochrom- bc_1 -Komplexes beschreibt einen Q-Zyklus für Ubichinon. Der Q-Zyklus wurde als Möglichkeit der Kopplung zwischen Elektronentransfer und Protonentranslokation in der Zellatmung und der Photosynthese postuliert (Mitchell, 1975a; Mitchell, 1975b; Mitchell, 1976). Er geht von einer passiven Membran aus, die für Protonen weitestgehend impermeabel ist. Die Membran enthält einen elektrisch neutralen Elektronenüberträger, dessen Reduktion mit der Aufnahme von Protonen und dessen Oxidation mit deren Abgabe verbunden ist. In Mitochondrien fällt diese Rolle dem Ubichinon zu, in Chloroplasten dem Plastochinon. Der Q-Zyklus wurde durch Ergebnisse biochemischer Untersuchungen als Mechanismus des Cytochrom- bc_1 -Komplexes bestätigt (Trumpower, 1990; Brandt & Trumpower, 1994; Trumpower & Gennis, 1994).

An der Q_o -Bindungsstelle des Cytochrom- bc_1 -Komplexes wird Ubihydrochinon (Ubichinol) gebunden und zu Ubichinon oxidiert (siehe Abb.2). Ein Elektron reduziert das Eisen-Schwefel-Zentrum im Rieske-Protein und wird dann über das Häm des Cytochrom c_1 auf das Häm eines Cytochrom- c -Moleküls übertragen. Dieser Elektronentransferweg wird als Hochpotentialkette des Cytochrom- bc_1 -Komplexes bezeichnet und dient des Elektronentransfers zur Cytochrom- c -Oxidase. Das andere Elektron der Ubichinol-Oxidation reduziert das Häm b_L , wird über das Häm b_H auf Ubichinon übertragen, das an der Q_i -Bindungsstelle und generiert dort ein Ubisemichinonradikal als Reaktionszwischenprodukt. Dieser Weg im Cytochrom b wird als Niedrigpotentialkette bezeichnet. Die Oxidation des Ubichinols während der ersten Hälfte des Q-Zyklus beinhaltet die Freisetzung zweier Protonen auf der Intermembranseite (p-Seite) sowie die Aufnahme eines Protons auf der Matrixseite (n-Seite) der inneren Mitochondrienmembran.

Das Ubichinon-Molekül an der Q_o -Bindungsstelle wird durch neues Ubichinol ersetzt. Durch dessen Oxidation wird in der zweiten Zyklushälfte je ein Elektron in die Hochpotentialkette und in die Niedrigpotentialkette übertragen.

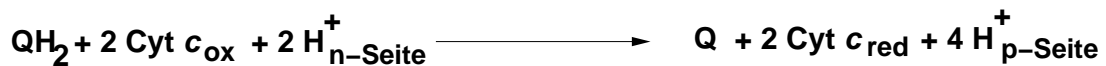
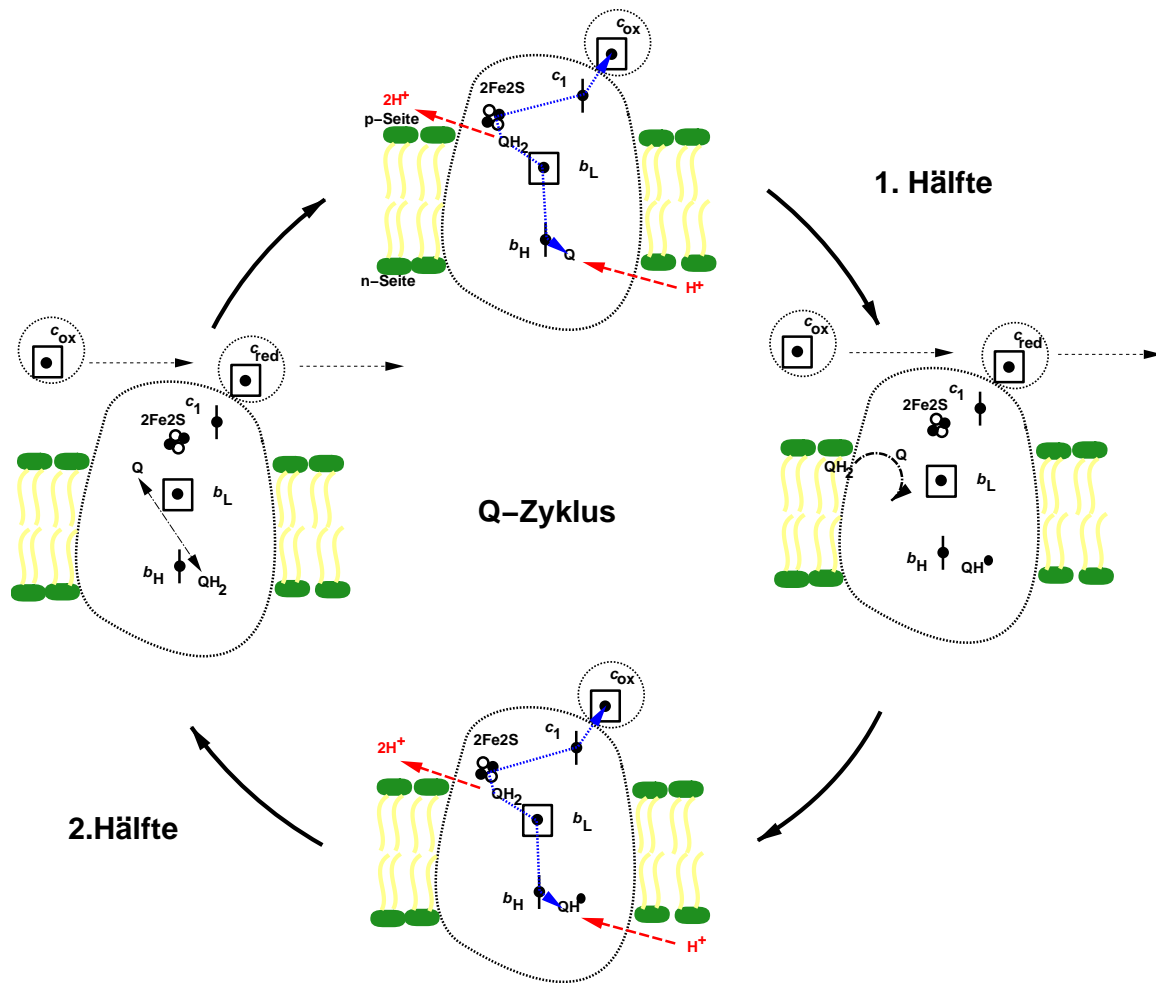
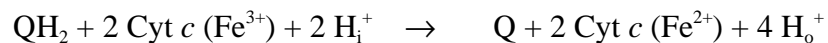


Abb.2: Schematische Darstellung des Q-Zyklus im Cytochrom- bc_1 -Komplex. Die erste Hälfte des Zyklus umfaßt die Oxidation eines Ubichinols an der Q_o -Bindungsstelle zu Ubichinon und die Reduktion eines Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle zu Ubisemichinon sowie die Reduktion eines Ferricytochrom c zu Ferrocytochrom c . Die zweite Hälfte des Zyklus umfaßt die Oxidation eines zweiten Ubichinols an der Q_o -Bindungsstelle und die Reduktion des Ubisemichinons zu Ubichinol sowie die Reduktion eines Ferricytochrom c zu Ferrocytochrom c .

Ein weiteres Molekül Cytochrom c und das Ubisemichinon an der Q_i -Bindungsstelle werden dadurch reduziert. Wie in der ersten Zyklushälfte ist die Oxidation des Ubichinols mit der Freisetzung zweier Protonen auf der Intermembranseite verbunden

und bei der Reduktion des Ubisemichinons wird ein Proton auf der Matrixseite aufgenommen.

Der komplette Q-Zyklus umfaßt somit die Oxidation zweier Moleküle Ubichinol an der Q_o -Bindungsstelle unter Reduktion eines Moleküls Ubichinon an der Q_i -Bindungsstelle und zweier Moleküle Cytochrom *c*. Die Chinoloxidation liefert vier Protonen auf der Intermembranseite, die Reduktion des Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle bedarf der Aufnahme zweier Protonen auf der Matrixseite:



Durch die Kopplung der Protonierungszustände mit den Redoxzustände des Ubichinons an den räumlich getrennten Bindungsstellen kann der Cytochrom-*bc*₁-Komplex zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beitragen, der für die Synthese von ATP nötig ist.

2.3.3 Die Elektronenübertragung mittels Cytochrom *c*

Cytochrom *c* ist ein kleines lösliches Protein mit einer kovalent gebundenen Häm *c* Gruppe. Das Protein gehört zu den Klasse I *c*-Typ Cytochromen (Ambler, 1982) und kommt im Intermembranraum von Mitochondrien vor (Nicholls, 1974). Strukturen von mitochondrialem Cytochrom *c* aus verschiedenen Organismen sind schon seit langer Zeit bekannt (Dickerson *et al.*, 1971; Swanson *et al.*, 1977; Ochi *et al.*, 1983; Louie *et al.*, 1988). Die Struktur von mitochondrialem Cytochrom *c* besteht aus fünf Helices $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ($\alpha 1$: 2-14, $\alpha 2$: 49-56, $\alpha 3$: 60-69, $\alpha 4$: 70-75, $\alpha 5$: 87-101), die durch Schleifen miteinander verbunden sind (Louie *et al.*, 1988; Louie & Brayer, 1990). Das Protein besitzt das charakteristische konservierte Hämbindungsmotiv CXXCH. Zwei Cysteinreste in der ersten Schleife binden das Häm kovalent über Thioetherbindungen. Die axialen Liganden des Häm-Eisens, ein Histidinrest und ein Methioninrest, liegen in der ersten bzw. letzten Schleife des Proteins. Das kovalent mit der Polypeptidkette verbundene Häm wird von den Helices in Form einer hydrophoben Tasche umgeben. Ein Teil der Hämgruppe mit den Pyrrolringen C und D ist solvenzexponiert. Die Aminosäuresequenz

des Cytochrom *c* ist stark konserviert (Hampsey *et al.*, 1986; Moore & Pettigrew, 1990). *S. cerevisiae* besitzt zwei Isoformen des Cytochrom *c* (Murphy *et al.*, 1992). Je nach Wachstumsbedingungen kann die Hefe die eine oder die andere Isoform des Cytochrom *c* bilden. Isoform I ist die häufiger vorkommende Isoform.

Das Redoxprotein dient als wasserlöslicher Elektronenüberträger vom Cytochrom-*bc*₁-Komplex zur Cytochrom-*c*-Oxidase. Außerdem ist Cytochrom *c* Substrat für die Cytochrom-*c*-Peroxidase, für das Cytochrom *b*₅, für das Cytochrom *b*₂ und für die Sulfat-Oxidase, die alle im Intermembranraum vorhanden sind (Pettigrew, 1987).

Für den Elektronentransport vom Cytochrom-*bc*₁-Komplex zur Cytochrom-*c*-Oxidase sind drei verschiedene Modelle vorgeschlagen worden (Pettigrew, 1987). Beim statischen, sogenannten Draht-Modell (*wire model*) bindet Cytochrom *c* gleichzeitig über zwei verschiedene Interaktionsflächen an beide Enzyme und verdrahtet die Redoxzentren Cytochrom *c*₁ und Kupfer A miteinander. Beim dynamischen Modell der lateralen Diffusion bewegt sich Cytochrom *c* zwischen den beiden Enzymkomplexen entlang der Membran hin und her. Ein weiteres dynamisches Modell beschreibt Cytochrom *c* als frei bewegliche Redoxkomponente im Intermembranraum der Mitochondrien. Untersuchungen mittels chemischer Modifikation von Lysinresten im Cytochrom *c* haben gezeigt, daß dessen Reaktion mit dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex und der Cytochrom-*c*-Oxidase über eine gemeinsame Interaktionsfläche verläuft (Rieder & Bosshard, 1980), was dem Draht Modell widerspricht. Das Modell der freien, drei-dimensionalen Diffusion des Cytochrom *c* im Intermembranraum konnte durch Bindungs- und Kinetikuntersuchungen unterstützt werden (Gupte & Hackenbrock, 1988a; Gupte & Hackenbrock, 1988b). Durch kinetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in *S. cerevisiae* Cytochrom *c* nur eingeschränkt difundieren kann (Boumans *et al.*, 1998). Demnach existiert in *S. cerevisiae* kein Vorrat (pool) an Cytochrom *c*. Ein Molekül Cytochrom *c*, daß durch einen Cytochrom-*bc*₁-Komplex reduziert wurde kann somit nur eine Cytochrom-*c*-Oxidase in unmittelbarer Nähe reduzieren. Diese Untersuchung spricht für das Modell der lateralen Diffusion des Cytochrom *c*.

2.3.4 Die Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae*

Strukturuntersuchungen am Cytochrom- bc_1 -Komplex sind erstmals mittels Elektronenmikroskopie an zweidimensionalen Kristallen des Enzymkomplexes aus *Neurospora crassa* durchgeführt worden (Wingfield *et al.*, 1979; Karlsson *et al.*, 1983). Die Ergebnisse dieser Elektronenmikroskopiestudien zeigten, daß das Enzym als Homodimer kristallisiert und daß die beiden Core-Proteine außerhalb des Transmembranbereichs liegen.

Durch Röntgenbeugung an dreidimensionalen Membranprotein-Kristallen ist die Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *Bos taurus* bei 2,9 Å Auflösung bestimmt worden (Xia *et al.*, 1997). Die Struktur beinhaltete nicht alle Untereinheiten des Enzymkomplexes. Jedoch konnten die Positionen der Redoxzentren sowie die Positionen der Bindungsstellen für die Inhibitoren Myxothiazol und Antimycin identifiziert werden. Die Bestimmung der Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus Huhn (*Gallus gallus*) bei 3,0 Å Auflösung zeigte, daß der Elektronentransfer von der Q_0 -Bindungsstelle zum Häm des Cytochrom c_1 mit einer Drehbewegung der C-terminale Domäne des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins verbunden ist. Die Position der C-terminalen Domäne des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins hängt von der Besetzung der Q_0 -Bindungsstelle ab. Die komplette Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *Bos taurus* bei 3,0 Å Auflösung bestätigte die Drehbewegung der C-terminalen Domäne des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins.

Die Kristallstruktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* (siehe Abb.3) mit neun Untereinheiten, im Komplex mit einem Antikörperfragment, ist bei einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt worden (Hunte *et al.*, 2000). Es konnte die Position des Inhibitors Stigmatellin an der Q_0 -Bindungsstelle und erstmals die Position des Substrates Ubichinon an der Q_i -Bindungsstelle gezeigt werden. Bedingt durch die hohe Auflösung lieferte die Kristallstruktur erstmals einen Einblick in mögliche Protonierungswege im Enzym, die für das Verständnis der Kopplung des Elektronentransfers mit der Protonentranslokation wichtig sind.

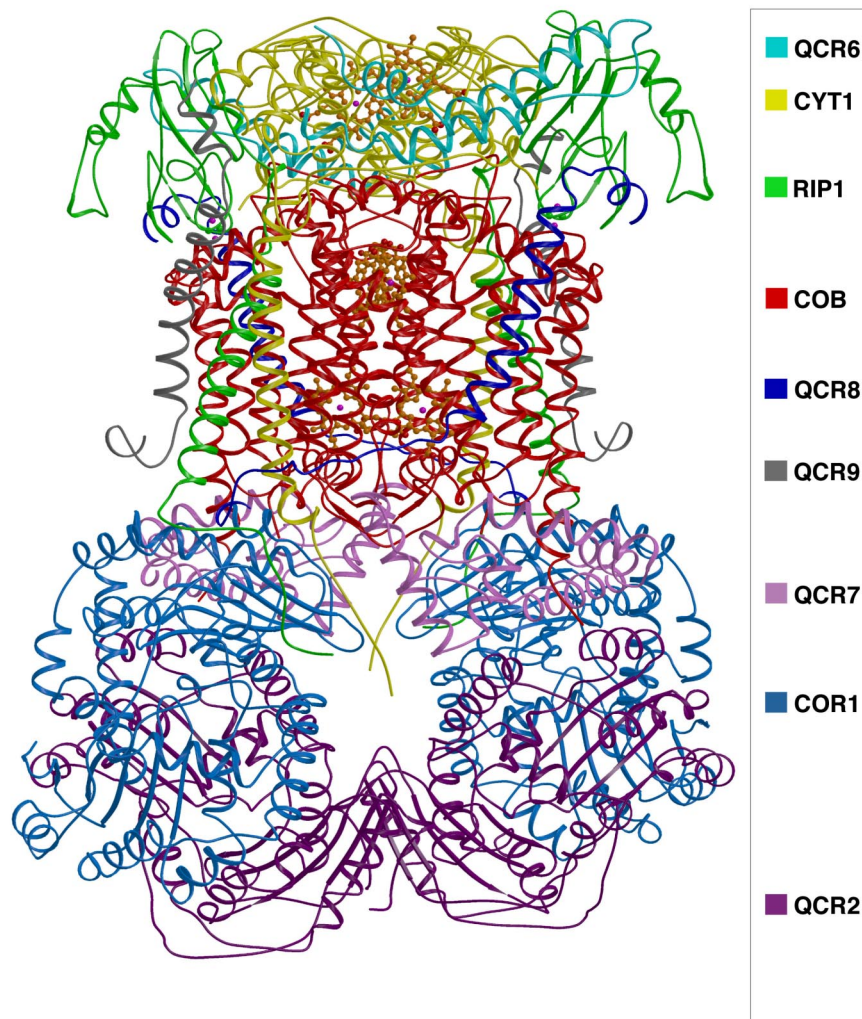


Abb. 3: Strukturmodell des homodimeren Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* mit neun Untereinheiten. Zur besseren Übersicht ist das Modell in der Bandendarstellung gezeigt und das Antikörper-Fragment ist nicht dargestellt. Die Redoxzentren sind in der Kugel-und-Stab-Darstellung gezeigt. Die Abbildung wurde von Carola Hunte zur Verfügung gestellt.

2.4 Zielsetzung

Die hochaufgelöste Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* bildete die Basis für die vorliegende Arbeit. Untersuchungen zur Struktur und Funktion von gebundenen Phospholipiden im Cytochrom- bc_1 -Komplex sollten dazu beitragen zu verstehen, warum diese die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Für das genauere

Verständnis des katalytischen Mechanismus des Cytochrom- bc_1 -Komplexes ist es wichtig die Interaktionen des Enzyms mit seinen Substraten zu kennen. Deshalb sollte die Bindung der Substrate Cytochrom c und Ubichinon an den Cytochrom- bc_1 -Komplex näher untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der am Cytochrom- bc_1 -Komplex gebundenen Phospholipide

In der Kristallstruktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes bei 2,3 Å Auflösung konnte im Transmembranbereich zusätzliche Elektronendichte gefunden werden. Diese Elektronendichte konnte gebundenen Phospholipiden zugeordnet werden.

3.1.1 Lokalisation der Transmembranregion im Cytochrom- bc_1 -Komplex

Zur exakten Lokalisation des Transmembranbereichs des Cytochrom- bc_1 -Komplexes wurde das Strukturmodell entlang der kristallographischen b-Achse, die der Membrannormalen entspricht, in Segmente von 2,5 Å Dicke unterteilt..

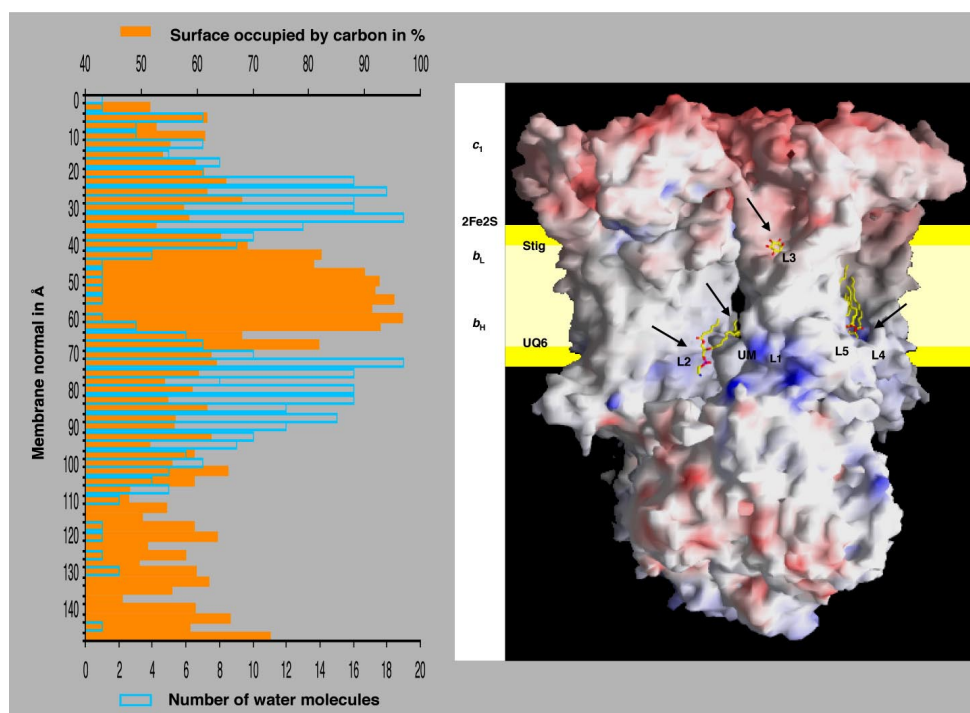


Abb. 4 : Lokalisation des Cytochrom- bc_1 -Komplexes relativ zur inneren Mitochondrienmembran. Links ist die graphische Auftragung des Anteils solvensexponierter Kohlenstoffatome und der Anzahl an

Wassermolekülen entlang der Membrannormalen zu sehen. Rechts ist die Oberfläche des Enzymdimers nach elektrostatischen Potential eingefärbt. Die Position der Membran, bestimmt anhand der Auftragung links, ist eingezeichnet. Die Abbildung stammt aus: Lange *et al.*, *The EMBO J.*, (akzeptiert).

Für jedes Segment wurde die Anzahl der Wassermoleküle bestimmt. Außerdem wurde der Anteil der oberflächenexponierten Kohlenstoffatome an der Gesamtoberfläche für jedes Segment ermittelt (Deisenhofer & Michel, 1989). Abbildung 4 zeigt die graphische Auftragung der beiden Parameter entlang der Membrannormalen. Für die Anzahl der Wassermoleküle ergeben sich zwei Maxima, die 37,5 Å auseinander liegen. Für den Anteil an oberflächenexponierten Kohlenstoffatomen ergibt sich ein 27,5 Å breiter Bereich mit Werten von über 80 %. Die Maxima der Wasserverteilung markieren die Außenseiten der Phospholipiddoppelschicht. Der große Anteil oberflächenexponierter Kohlenstoffatome indiziert den hydrophoben Bereich der Membran, in dem die Fettsäureketten der Phospholipide liegen. Demnach ergibt sich für die Dicke einer Phospholipidkopfgruppe ein Wert von etwa 5 Å. Diese Werte stimmen sehr gut mit den experimentell bestimmten Werten für eine Phospholipiddoppelschicht mit Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) überein (Lewis & Engelman, 1983).

Tab. 2: Position der Redoxzentren, des Stigmatellins, des Ubichinons und der Phospholipide relativ zur Membrannormalen. Angegeben sind in Å die Positionen der Eisen-Atome der Häme, die mittlere Eisenposition des Eisen-Schwefel-Zentrums, die Positionen der Phosphoratome der Phospholipide sowie die mittlere Position der ligandierten Sauerstoffatome des Stigmatellins und des Ubichinons. Der Nullpunkt der Skala der Membrannormalen wurde bei -5 Å auf der kristallographischen b-Achse gesetzt.

Kofaktor	Position entlang der Membrannormalen
Häm c_1	13,8 Å
[2Fe-2S]-Zentrum in b-Position	34,3 Å
Lipidkopfgruppen, Intermembranseite	35-40 Å
Stigmatellin (Stig)	40,5 Å
Lipid L3 (PI)	43,6 Å
Häm b_L	43,7 Å

Häm b_H	63,5 Å
Lipid L5 (CL)	67,7 Å
Ubichinon (UQ6)	68,5 Å
Lipid L4 (PE)	69,6 Å
Detergens (UM)	70,7 Å
Lipidkopfgruppen, Matrixseite	70-75 Å
Lipid L1 (PC)	72,6 Å
Lipid L2 (PE)	73,8 Å

Die Position der Kofaktoren kann nun in Bezug zur Lage der Lipidmembran relativ zu dem Membranproteinkomplex bestimmt werden (siehe Tab.2). Das Häm des Cytochrom c_1 liegt demnach etwa 25 Å oberhalb der Mitochondrienmembran im Intermembranraum. Das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins, in der b-Position, liegt direkt an der Intermembranseite der Membran. Die beiden Hämgruppen des Cytochrom b liegen innerhalb des hydrophoben Teils der Membran. Das Häm b_L liegt etwa 3,5 Å vom Bereich der Lipidkopfgruppen entfernt, das Häm b_H ist etwa 4,5 Å vom Bereich der Kopfgruppen auf der Matrixseite entfernt. Für die Substrat-Bindungsstellen ergibt sich, daß die Bindungsstelle für Cytochrom c mehr als 25 Å oberhalb der Membranoberfläche liegt, während beide Bindungsstellen für Chinonspezies (Q_o -Bindungsstelle und Q_i -Bindungsstelle) an den Außenseiten des hydrophoben Membranbereichs liegen. Die Q_o -Bindungsstelle mit gebundenem Stigmatellin ist etwa 0,5 Å von dem Bereich der Lipidkopfgruppen entfernt, während die Q_i -Bindungsstelle mit dem gebundenen Coenzym Q_6 etwa 4,5 Å von dem Bereich der Kopfgruppen entfernt ist.

3.1.2 Protein-Protein-Interaktionen im Cytochrom- bc_1 -Komplex

Um die mögliche Rolle der Phospholipide bei der Stabilisierung des Enzymkomplexes zu untersuchen wurden die Interaktionsflächen zwischen den Untereinheiten des Komplexes innerhalb eines Monomers und zwischen den beiden Monomeren ermittelt. Als statistischer Wert für eine stabile Interaktionsfläche zweier Proteine gilt ein Wert von

etwa 1600 Å² (LoConte *et al.*, 1999). Die Interaktionsfläche wird als Fläche, die durch die Assoziation zweier Untereinheiten verloren geht definiert. Die Größe der Interaktionsfläche hängt nicht von den Molekularmassen der Komplexpartner ab. Interaktionsflächen von Proteinen unterscheiden sich je nach Funktion der Proteinkomplexe auch hinsichtlich ihrer Polarität. Daher wurde auch der polare Anteil der Interaktionsflächen bestimmt.

3.1.2.1 Interaktionen innerhalb eines Monomers

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die beiden Core Proteine 1 und 2 eine große Interaktionsfläche haben. Innerhalb eines Monomers des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wird der Transmembranteil des Rieske-Proteins durch relativ kleine Interaktionsflächen an die Untereinheiten Core-Protein 1, Cytochrom *b*, Cytochrom *c*₁, Untereinheit 8 und Untereinheit 9 gebunden.

Tab. 3: Interaktionsflächen innerhalb eines Monomers des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes. Der jeweils obere Wert ist die Größe der Interaktionsfläche zweier Untereinheiten in Å². Der jeweils untere Wert ist der polare Anteil der Interaktionsfläche in %. Leere Felder bedeuten fehlende Interaktionen.

	COR1	QCR2	COB	CYT1	RIP1	QCR6	QCR7	QCR8	QCR9
COR1		2884 27,0	898 50,5	188 14,9	1210 52,8		50 38,1	1714 37,1	605 42,3
QCR2	2884 27,0								
COB	898 50,5			3278 29,2	1123 23,2		3588 23,5	2845 22,5	
CYT1	188 14,9		3278 29,2		1484 19,3	2264 29,0	750 23,6	1461 29,2	1643 27,9
RIP1	1210 52,8		1123 23,2	1484 19,3				1092 28,0	1301 30,2
QCR6				2264 29,0				367 57,4	
QCR7	50 38,1		3588 23,5	750 23,6				1095 36,6	
QCR8	1714 37,1		2845 22,5	1461 29,2	1092 28,0		1095 36,6		
QCR9	605 42,3			1643 27,9	1301 30,2				

Untereinheit 8 interagiert hauptsächlich mit Core Protein 1 und mit Cytochrom *b*. Cytochrom *b* interagiert mit Cytochrom *c*₁ und mit der Untereinheit 7 über relativ große Interaktionsflächen.

3.1.2.2 Interaktionen zwischen den beiden Monomeren im Cytochrom-*bc*₁-Komplex

Auf Grundlage einer stabilen Grenzfläche zwischen zwei Proteinen von über 1600 Å² stammen die Interaktionen im dimeren Enzym hauptsächlich von den katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b* und Rieske-Protein sowie vom Core-Protein 2 (siehe Tab 4).

Tab. 4: Interaktionen zwischen den beiden Monomeren im homodimeren Cytochrom-*bc*₁-Komplex. Der jeweils obere Wert ist die Größe der Interaktionsfläche zweier Untereinheiten in Å². Der jeweils untere Wert ist die Polarität der Interaktionsfläche in %. Leere Felder bedeuten fehlende Interaktionen. Untereinheiten im Monomer A sind in kursiver Schrift gekennzeichnet.

	COR1	QCR2	COB	CYT1	RIP1	QCR7	QCR8
<i>COR1</i>						390 42,4	151 31,3
<i>QCR2</i>		2024 58,3				771 40,9	
<i>COB</i>			2201 24,6		2223 25,5		399 33,6
<i>CYT1</i>				609 37,5	18 30,4		
<i>RIP1</i>			2223 25,5	18 30,4			180 44,6
<i>QCR7</i>	390 42,4	771 40,9					
<i>QCR8</i>					180 44,6		377 33,6

Das Cytochrom *b* aus beiden Monomeren interagiert miteinander und bildet mit der C-terminalen Domäne des Rieske-Proteins, das sich in der b-Position befindet, eine relativ große Interaktionsfläche von über 2000 Å². Das Core Protein 2 wird innerhalb eines Monomers nur durch das Core Protein 1 an den Komplex gebunden. Die Interaktion der beiden Monomere beinhaltet eine Interaktion der beiden Core Proteine 2.

3.1.3 Analyse von Phospholipiden im Cytochrom-*bc*₁-Komplex

Durch qualitative und quantitative Analyse von Lipidextrakten aus Proteinproben konnten die Phospholipide im Cytochrom-*bc*₁-Komplex identifiziert werden. Lipidextrakte aus den unterschiedlichen Reinigungsstufen und aus Kristallen des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Zudem wurden Phospholipide in dem Lipid-Gesamtextrakt aus der ersten Proteinreinigungsstufe nach der DEAE-FF-Sepharose-Säule erfolgte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Dies wurde von Frau Dr. Katleen Gura am IMB in Jena durchgeführt.

3.1.3.1 Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie

Die Analyse von Lipidextrakten aus Proben des Enzym nach den unterschiedlichen Reinigungsstufen wurde mit eindimensionaler Dünnschichtchromatographie vorgenommen (siehe Abb. 5). Das Chromatogramm zeigt bei den unterschiedlichen Proben relativ viele Substanzflecken. Der bräunliche Fleck in der Mitte der Laufstrecke ist Häm, das vermutlich aus dem denaturierten Cytochrom *b* extrahiert wurde. Ein Teil der Substanzflecken konnte durch die Auftragung von Standardsubstanzen identifiziert werden. Demnach enthalten alle Proben des Enzyms Ubichinon (am oberen Ende der Laufstrecke), und Cardiolipin (im unteren Drittel der Laufstrecke). Durch Vergleich der einzelnen Proben zeigt sich, daß während der Proteinreinigung der Anteil an lipophilen Substanzen abnimmt. Die genaue Analyse der Phospholipide in den Proben war mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

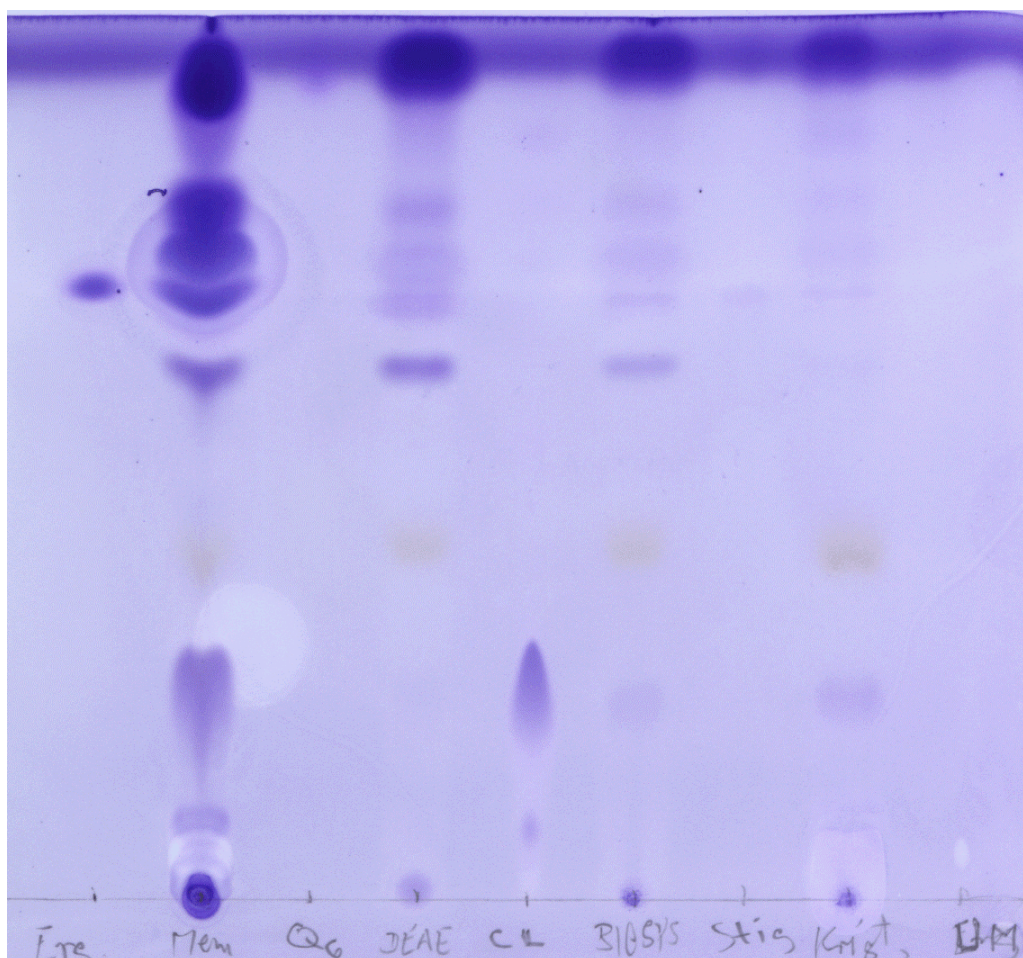


Abb. 5: Eindimensionales Dünnschichtchromatogramm von Lipidextrakten aus dem Cytochrom- bc_1 -Komplex nach den verschiedenen Proteinreinigungsstufen und aus Kristallen. Aufgetragen sind, von links nach rechts: Ergosterol, Membransolubilisat-Extrakt, Coenzym Q_6 , DEAE-FF-Extrakt, CL, DEAE-HyperD-Extrakt, Stigmatellin, Kristall-Extrakt und Undecyl-maltosid.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie wurde eine Probe des Cytochrom- bc_1 -Komplexes nach der ersten Reinigungsstufe der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Abbildung 6 zeigt das zweidimensionale Chromatogramm der Phospholipide. Klar identifizieren ließen sich PC, PE, PI und CL. Außerdem konnte durch die Analyse noch PA und ein nicht identifiziertes Lipid X gefunden werden. Mittels Densitometrie der angefärbten Zonen konnten die relativen Lipidmengen in Molprozent ermittelt werden.

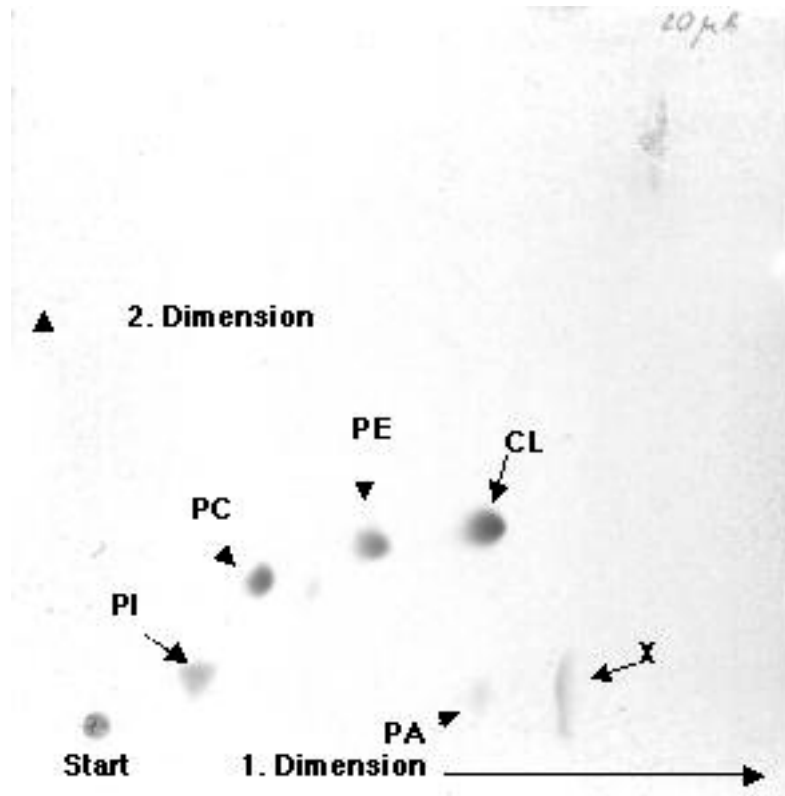


Abb. 6: Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm des Lipidextraktes aus dem Cytochrom- bc_1 -Komplex nach der ersten Proteinreinigungsstufe. Das Chromatogramm zeigt Substanzflecken für die Lipide PC, PE, PI, CL, PA sowie für ein nicht identifiziertes Lipid X.

Tab. 5: Relative molare Anteile der Phospholipide nach der ersten Reinigungsstufe bestimmt durch densitometrische Auswertung eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramms. Zum Vergleich sind die relativen molaren Anteile der Phospholipide in der inneren Mitochondrienmembran gezeigt (Zinser *et al.*, 2000). Das Phospholipid X konnte nicht identifiziert werden.

Phospholipid	Anteil im Gesamtextrakt in mol%	Zusammensetzung der inneren Membran in mol%
PC	27 %	38 %
PE	27 %	24 %
CL	22 %	16 %
PI	16 %	16 %
PA	5 %	2 %
X	3 %	—

Die Anteile der einzelnen Phospholipide im Lipidextrakt sind der Zusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran sehr ähnlich (siehe Tab.5). Im Vergleich mit der Lipidmembran sind PE und CL angereichert, PC ist abgereichert. Dies kann auf eine Assoziation des PE und des CL mit dem Enzym hindeuten. Der höhere Anteil an PA in der Probe kann durch Hydrolyse von Phospholipiden mit der angesäuerten Extraktionslösung erklärt werden.

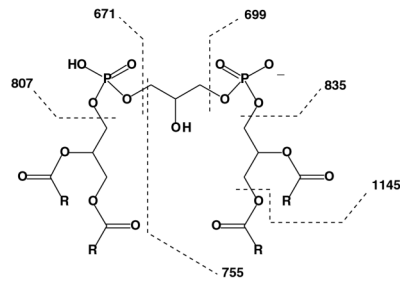
3.1.3.2 Analyse von Phospholipiden mittels ESI-Massenspektrometrie

Die "Elektrospray-Ionisations"-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde für die Analyse der Phospholipidspezies in den gelösten und kristallinen Proben des Cytochrom- bc_1 -Komplexes benutzt. In der ESI-Massenspektrometrie bilden die Phospholipide aufgrund ihrer Kopfgruppenladung positive oder negative Ionen (Lehmann, 1996; Murphy, 1993). Positive Ionen erwartet man nur bei Anwesenheit von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin. In Ausnahmefällen, bei hohen Natriumkonzentrationen kann PI auch positive Ionen bilden (Sherman *et al.*, 1985). Negative Ionen erwartet man bei Anwesenheit von Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinosit, Phosphatidylserin und manchmal auch bei Phosphatidylcholin (Lehmann *et al.*, 1997).

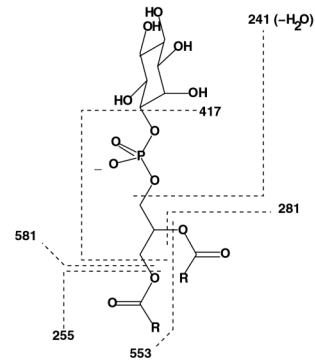
3.1.3.2.1 Identifizierung der Phospholipide mittels Tandem-ESI-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Phospholipide in den Proben des Cytochrom- bc_1 -Komplexes wurden Phospholipid-Standards (DOPC, DOPE, TOCL, Sojabohnen PI) der Tandem-Massenspektrometrie unterworfen. Diese lieferte für jedes Phospholipid charakteristische Fragmentationensignale (Lehmann, 1996). Die Identifizierung der Phospholipide erfolgte durch die in Abbildung 7 dargestellten charakteristischen Fragmentierungsreaktionen (Jensen *et al.*, 1987; Brügger *et al.*, 1997).

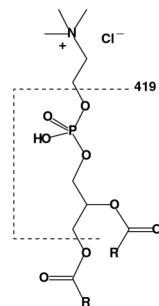
CL 70:4



PI, 34:1



PC, 34:1



PE, 34:1

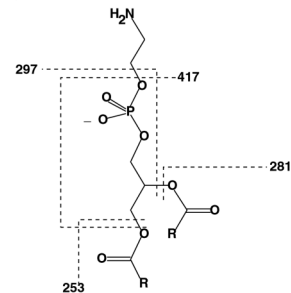


Abb. 7: Strukturformeln der identifizierten Phospholipide PC, PE, PI und CL sowie Kennzeichnung ihrer charakteristischen Fragmentierungsreaktionen.

Bei der Fragmentierung von Phosphatidylinosit (mit der Masse 835) entstehen charakteristische Tochterionen mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) von 581, 553, 417, 281, 255 und 241 (siehe Abb.8). Durch Abspaltung jeweils einer Fettsäure kommt es zur Bildung des Tochterions mit der Masse 581 (Abspaltung von 16:0) und mit der Masse 553 (Abspaltung von 18:1). Das Fragment mit der Masse 417 entspricht Lysophosphatidsäure mit einer Ölsäurekette, die Fragmente mit 281 und 255 entsprechen Ölsäure (18:1) und Palmitinsäure (16:0). Das Tochterion mit $m/z=241$ entspricht dehydratisiertem Inositphosphat (Jensen *et al.*, 1987; Brügger *et al.*, 1997) wodurch PI zweifelsfrei identifizierbar ist.

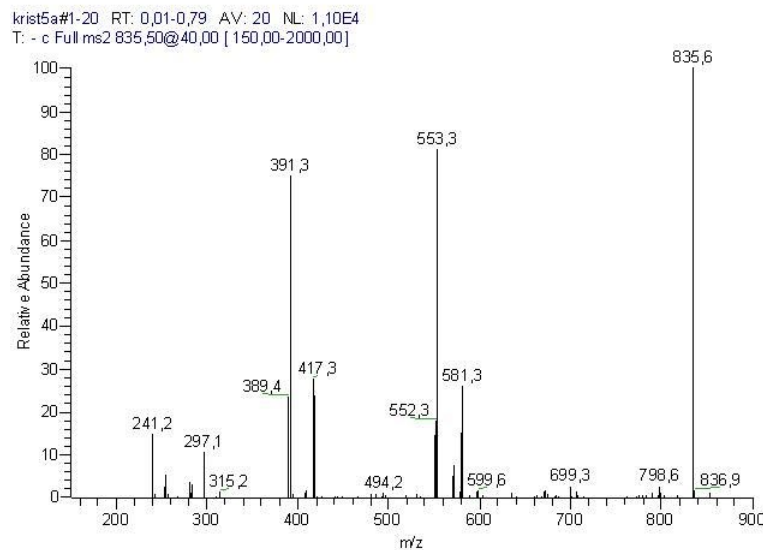


Abb. 8: Fragmentierungsmassenspektrum im Negativ-Modus des Ions mit $m/z=835$ (PI 34:1) aus dem Lipidextrakt von Kristallen des Cytochrom- bc_1 -Komplexes.

Durch Fragmentierung von Phosphatidylethanolamin (mit der Masse 716) entstanden Tochterionen mit den Massen 450, 417, 297, 281 und 253. Durch Abspaltung von RCHCO (Ölsäure ohne Estersauerstoff) entsteht das Ion mit $m/z=450$. Das Ion mit der Masse 417 ist Lysophosphatidsäure (mit 18:1). Die letzteren beiden Ionen entsprechen Ölsäure (18:1) und Palmitoleinsäure (16:1).

Die Fragmentierung des Phosphatidylcholins ($m/z=794$) ergab Tochterionen mit einer Masse von 643, 493 und 419.

Cardiolipin (mit der Masse 1428) zeigt bei der Fragmentierung Tochterionen mit den Massen 1145, 835, 807, 755, 699, 671 und 417. Das Ion mit der Masse 1145 ist ein Lysocardiolipin (Abspaltung von 18:1). Die Ionen mit $m/z=835$ und $m/z=807$ entstehen durch Abspaltung einer der beiden Diacylglycerin-Einheiten (mit zwei Ölsäureketten, bzw. einer Ölsäurekette und einer Palmitoleinsäurekette). Die Ionen mit 699 und 671

entsprechen Phosphatidsäurefragmenten (mit 2x18:1 bzw. 18:1/16:1). Die Ionen mit 281 und 253 entsprechen den Fettsäurefragmenten Ölsäure und Palmitoleinsäure.

3.1.3.2.2 Analyse von Phospholipiden in Proteinproben aus der Proteinreinigung mittels ESI-Massenspektrometrie

Die Analyse der Phospholipide aus Proteinproben wurde sowohl im Positiv-Ionen Bereich als auch im Negativ-Ionen Bereich durchgeführt (siehe Tab.6). Alle Proteinproben, sowohl aus den beiden Reinigungsstufen (DEAE-FF-Sepharose und DEAE-HyperD) als auch aus den Kristallen zeigten intensive Signale für die Detergenzien Dodecylmaltosid (533/1043, bzw. 511/1021) und Undecylmaltosid (519/1015, bzw. 495/993). Außerdem waren in allen Proben im positiven Meßmodus deutliche Signale für Häm (617), vermutlich aus dem Cytochrom *b* zu sehen, da die Hämgruppe des Cytochrom *c*₁ kovalent an die Polypeptidbrücke gebunden ist (Hunte *et al.*, 2000).

In den Proben aus der ersten Reinigungsstufe konnten positive Ionen mit den Massen 752, 780, 808 detektiert werden. Die Ionen mit den Massen 752 und 780 konnten durch Fragmentierung von Cholinphosphat als PC Ionen identifiziert werden. Im Meßbereich für negative Ionen konnten solche mit den Massen 808, 836 und 864 detektiert werden. Diese Ionen wurden durch Fragmentierung als PI Ionen (32:1, 34:1 und 36:1) identifiziert. Es konnten auch Ionen mit den Massen 672, 700, 714 und 728 sowie Ionen mit den Massen 1345, 1373, 1401, 1429 und 1457 detektiert werden. Diese Signale konnten zweifach bzw. einfach negativ geladenen CL Ionen zugeordnet werden.

Die Proteinproben nach der zweiten Reinigungsstufe wurden ebenfalls im positiven Meßbereich als auch im negativen Meßbereich untersucht (siehe Tab.7). Im positiven Meßbereich konnten Ionen mit den Massen 752, 758 und 780 identifiziert werden. Im negativen Meßbereich traten besonders Molekülionen für CL hervor.

Tab. 6: Zusammenstellung der mit der ESI-MS identifizierten Phospholipide nach der ersten Reinigungsstufe (DEAE-FF-Sephrose). Nicht identifizierte Ionen sind mit n.i. gekennzeichnet.

m/z des Kations	Substanz	m/z des Anions	Substanz
616	Häm	644	n.i.
685	n.i.	672	CL 66:4
752	PC 32:2	700	CL 68:4
775	PC 32:2	714	CL 70:4
780	PC 34:2	728	CL 72:4
803	PC 34:2	808	PI 32:1
831	PC 36:2,	836	PI 34:1
859	n.i.	864	PI 36:1
881	n.i.	1345	CL 64:4
899	n.i.	1373	CL 66:4
		1401	CL 68:4
		1428	CL 70:4
		1457	CL 72:4

Neben den einfach negativ geladenen $[\text{CL-H}]^-$ Ionen mit den Massen 1345, 1373, 1401, 1429 und 1457 konnten auch die zweifach negativ geladenen $[\text{CL-2H}]^{2-}$ Ionen mit den Massen 686, 672, 700, 714 und 728 detektiert werden. Einfach negativ geladene Ionen mit den Massen 808, 836 und 864 konnten detektiert werden und mittels Tandem MS als PI identifiziert werden.

Tab. 7: Zusammenstellung der identifizierten Phospholipide nach der zweiten Reinigungsstufe. Nicht identifizierte Ionen sind mit n.i. gekennzeichnet.

m/z des Kations	Substanz	m/z des Anions	Substanz
616	Häm	672	CL 66:4
685	n.i.	686	PE 32:2
692	n.i.	700	CL 68:4
719	n.i.	714	CL 70:4, PE 34:2
747	n.i.	728	CL 72:4
753	PC 32:2	794	PC 34:1
758	n.i.	830	n.i.
775	PC 32:2	833	PI 34:2
780	PC 34:2	863	PI 36:1
803	PC 34:2	1373	CL 66:4
831	PC 36:2	1401	CL 68:4
859	n.i.	1428	CL 70:4
881	n.i.	1457	CL 72:4

3.1.3.2.3 Analyse von Phospholipiden in Kristallen des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes mittels ESI-Massenspektrometrie

Die Analyse von Membranlipiden in Membranprotein-Kristallen mittels ESI-MS ist für das Bakteriorhodopsin gezeigt worden (Essen *et al.*, 1998). Kristalle des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wurden mit dieser Methode analysiert. Die Phospholipide im Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus den beiden Reinigungsstufen (DEAE-FF-Sepharose und DEAE-HyperD) wurden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie sowohl im positiven als auch im negativen Meßmodus qualitativ nachgewiesen. Die Lipidextrakte aus Kristallen des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes konnten jedoch nur im Negativ-Ionenmodus untersucht werden, da das bei der Kristallisation anwesende Polyethylenglycol (PEG-4000) sehr intensive Signale im Positiv-Ionenmodus zeigte, die eine Detektion von

Phospholipidsignalen unmöglich machte. Abbildung 9 zeigt das Negativionen-Massenspektrum des Lipidextraktes aus Kristallen des Cytochrom- bc_1 -Komplexes.

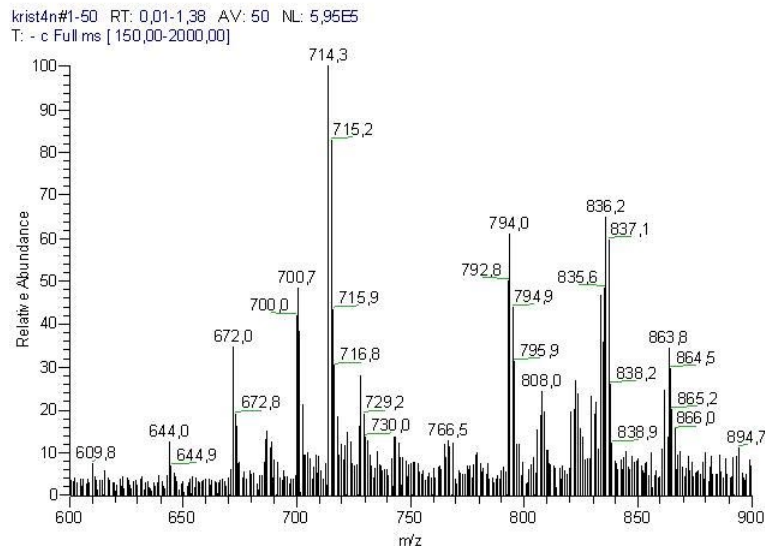


Abb. 9: Negativ-Ionen-Massenspektrum des Lipidextraktes aus Kristallen im Bereich von $m/z=1300-1500$.

Insgesamt konnten vier verschiedene Phospholipide identifiziert werden (siehe Tab.8). Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinosit (PI) und Cardiolipin (CL) zeigten Ionensignale der Form $(M-H)^-$. Zusätzlich zu den $(M-H)^-$ Molekülonen zeigte Cardiolipin Ionen der Form $(M-2H)^{2-}$. Diese erschwerten die Auswertung der Signale des PE bei $m/z=714$ (siehe Abb.9). Phosphatidylcholin (PC) war nur als Molekülon der Form $(M+Cl)^-$ detektierbar. Das Auftreten dieser ungewöhnlichen Ionen des PC (Lehmann *et al.*, 1997) kann auf die relativ hohe Konzentration von Chloridionen in der Probe (250-300 mM) zurückzuführen sein.

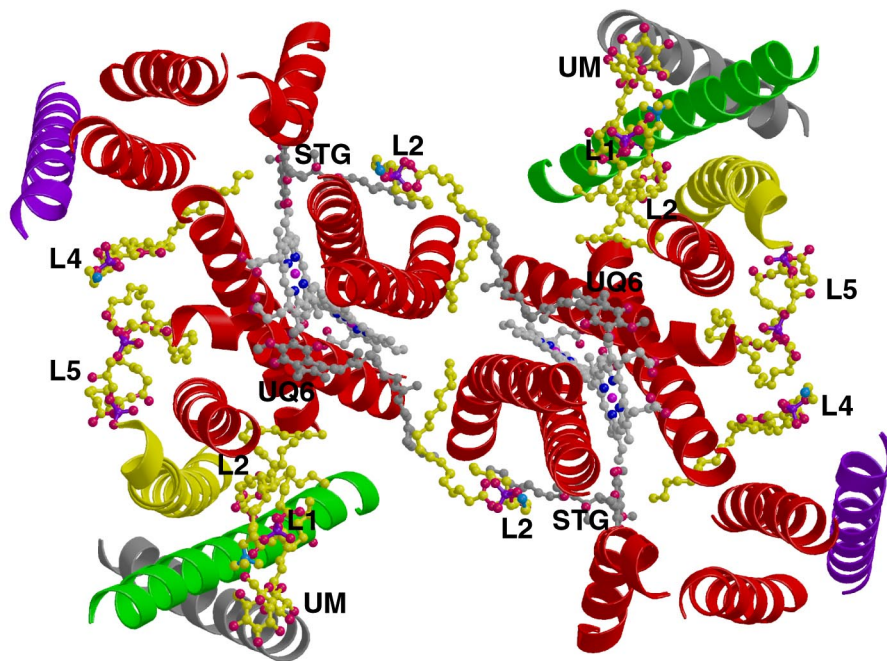
Tab. 8: Zusammenstellung der Phospholipid-Signale in den Kristallproben des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes.

m/z des Anions	Substanz
672	CL 64:4
686	CL 66:4, PE 32:2
700	CL 68:4
714	CL 70:4, PE 34:2
728	CL 72:4
742	PE 36:2
836	PI 34:1
864	PI 36:1
1345	CL 64:4
1373	CL 66:4
1401	CL 68:4
1428	CL 70:4
1457	CL 72:4

3.1.4 Identifizierung der gebundenen Phospholipide in der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes

Die verfeinerte hochauflösende Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes zeigte zusätzliche Differenz-Elektronendichte (Fo-Fc) im Transmembranbereich des Enzyms. Diese Elektronendichte in Form von sogenannten "hairpins" ist typisch für Phospholipide. Phosphatidsäure (PA) mit zwei Stearinsäureketten (DSPA, 36:0 PA) wurden in diese Elektronendichte manuell eingepaßt. Obwohl durch die Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte, daß die Phospholipide im Cytochrom-*bc*₁-Komplex teilweise ungesättigte Fettsäureketten enthalten wurden

Phospholipide mit gesättigten Fettsäureketten eingesetzt. Die Position der PA Moleküle wurde mittels Positionsverfeinerung optimiert. Im Kopfgruppenbereich der Lipide tauchte nach dieser Verfeinerung zusätzliche Differenz-Elektronendichte (Fo-Fc) auf. In diese Elektronendichte wurde die jeweils optimal passende Kopfgruppe manuell eingepaßt und die Positionen der Lipide wurden erneut durch Positionsverfeinerung optimiert. Die finale Verfeinerung mit anschließender Verfeinerung der individuellen Temperaturfaktoren resultierte in einem R-Faktor von 21,8 % und einem freien R-Faktor von 24,9 %.



der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran während Region II nahe der Intermembranseite liegt.

3.1.4.1 Phospholipidbindung in der Region I

In der Region I zeigte sich Elektronendichte mit einem ausgeprägten flächigen Kopf und einer schlauchartigen Fortsetzung. An diese Stelle wurde ein Detergensmolekül (n-Undecyl- β -D-maltopyranosid, UM) eingepaßt und verfeinert. Die Maltopyranosidgruppe des Detergensmoleküls liegt zwischen den Untereinheiten Core-Protein 1 und der Untereinheit 9 (siehe Abb.11A). Direkte polare Interaktionen gibt es zwischen der Kopfgruppe des Detergens und Aminosäureresten des Core-Protein 1 (Leu426, Trp427, Asp428, Met453, Arg456) bzw. der Untereinheit 9 (Ala15, Val16, Val18). Hydrophobe Interaktionen mit der Kopfgruppe bzw. der Alkylkette existieren mit den Aminosäuren Tyr57 des Rieske-Proteins, Met455 des Core-Proteins1 sowie Phe17 und Ile21 der Untereinheit 9.

Direkt benachbart zu dem Detergensmolekül befindet sich Phospholipidmolekül L1, das aufgrund seiner großen Differenzelektronendichte im Kopfgruppenbereich als Phosphatidylcholin (PC) identifiziert wurde (siehe Abb.11B). Die Fettsäureketten dieses Lipids erstrecken sich entlang der Helix E des Cytochrom *b* und zeigen auf die Isoprenoidkette des gebundenen Ubichinonmoleküls. Die Phosphodiestergruppe interagiert mit His222 des Cytochrom *b*. His222 ist in mitochondriellem Cytochrom *b* konserviert und ist benachbart zu Met221, das an der Bindung des Ubichinons in der Reduktionsstelle beteiligt ist (Hunte *et al.*, 2000) und für die Kinetik der Ubichinon-Reduktion an der Q_i-Bindungsstelle sehr wichtig ist (Brasseur & Brivet-Chevillotte, 1995). In unmittelbarer Nähe zu Lipid L1, an der Grenze zwischen dem N-Terminus des Cytochrom *b* und dem Core-Protein 1 konnte weitere ausgedehnte Fo-Fc-Elektronendichte beobachtet werden. Da die Form dieser Elektronendichte der des Lipid L5 (Cardiolipin) ähnlich ist, wurde versucht ein Modell für Cardiolipin zu verfeinern. Die Verfeinerung ergab starke Fc-Fo-Dichte für eine der beiden Phosphodiestergruppen. Deshalb war die Identifizierung dieses Lipidmoleküls nicht möglich.

Zwischen den D-Helices von Cytochrom *b* an der Kontaktfläche beider Monomere im dimeren Enzym liegt Phospholipid L2 (siehe Abb.11C). Dieses Phospholipid wurde als Phosphatidylethanolamin (PE) identifiziert und aufgrund seiner Position zwischen den beiden Monomeren als "intermonomeres" Lipid bezeichnet. Die Verbindung des Phospholipidmoleküls mit beiden Monomeren erfolgt durch Koordination seiner beiden Ester-carbonylsauerstoffe mit Asn7 des Cytochrom *b* und Asn115 des Cytochrom *b* im komplementären Monomer. Die Fettsäurereste des Lipids erstrecken sich entlang der Helices D und A* des komplementären Cytochrom *b*. Fettsäurekette 1 interagiert mit Val8 des Cytochrom *b*, Fettsäurekette 2 interagiert mit Val13 des Cytochrom *b* im komplementären Monomer.

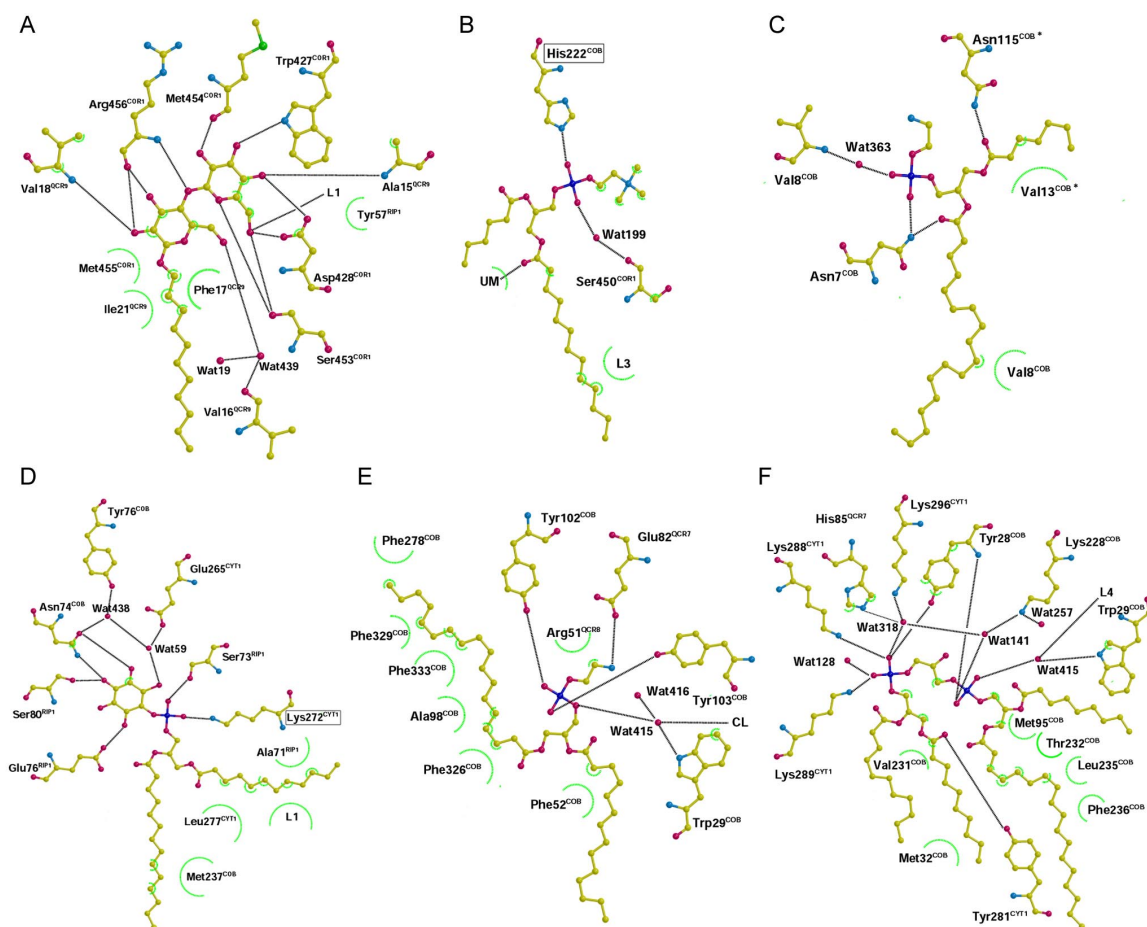


Abb. 11: Ligandierung der gebundenen Phospholipide und des Detergens im Cytochrom-*bc*₁-Komplex. A Detergens (UM), B Lipid L1 (PE), C Lipid L2 (PE), D Lipid L3 (PI), E Lipid L4 (PE), F Lipid L5 (CL). Abbildung stammt aus: Lange *et al.*, *The EMBO J.* (akzeptiert)

3.1.4.2 Phospholipidbindung in der Region II

Eines der Phospholipide, Lipid L3 (siehe Abb11D), befindet sich in einer Position nahe der Intermembranseite der inneren Membran an der Kontaktstelle der drei katalytischen Untereinheiten (Region II). Durch Verfeinerungsrechnungen mit einem Modell für Phosphatidsäure konnte eine ausgedehnte Fo-Fc-Dichte für die Kopfgruppe dieses Lipids erhalten werden. Eine ähnlich strukturierte Elektronendichte ist aus dem aktiven Zentrum des Enzyms Inosit-monophosphatase mit gebundenem Inositmonophosphat bekannt (Bone *et al.*, 1994). Durch Verfeinerungsrechnungen mit dem Modell für Phosphatidylinosit (PI) konnte dieses Lipid als PI identifiziert werden.

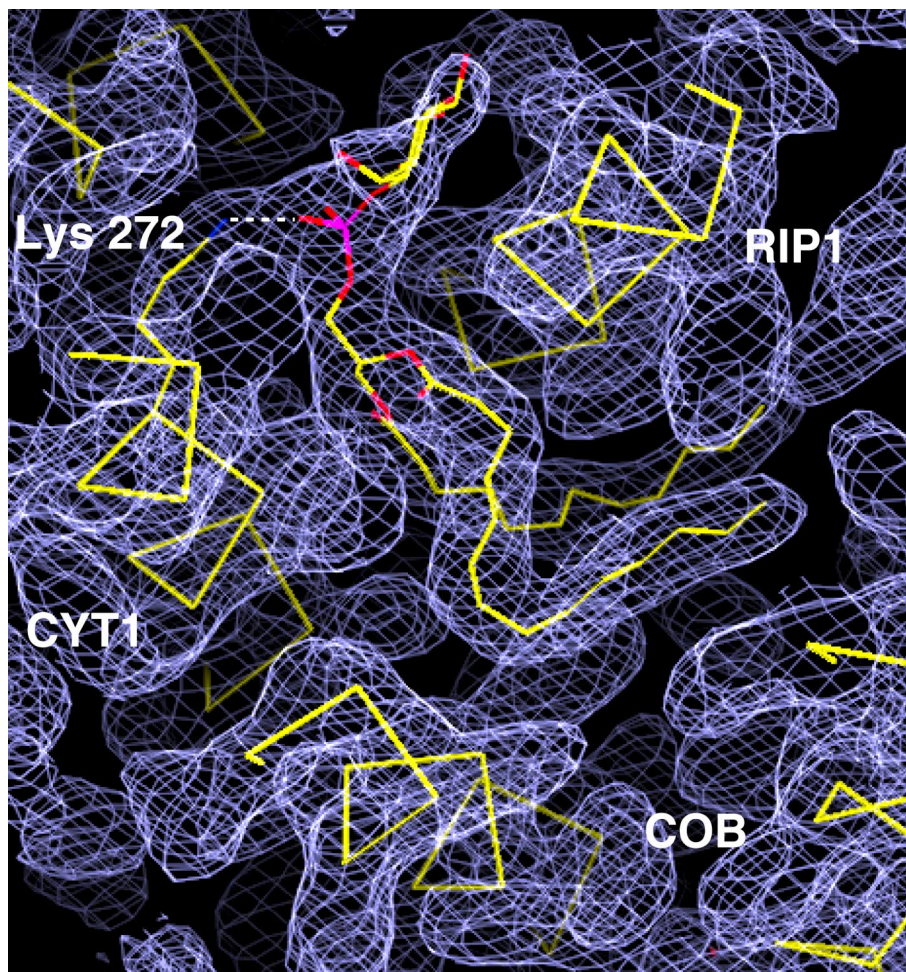


Abb. 12: Das interhelikale Phosphatidylinosit mit den umgebenden Transmembranhelices des Cytochrom *b* (COB), des Cytochrom *c*₁ (CYT1) sowie des Rieske-Proteins (RIP1) betrachtet von der Intermembranseite aus. Die Polypeptidketten und das Lipidmolekül ist mit der (2Fo-Fc)-Elektronendichte dargestellt. Die Abbildung stammt aus: Lange *et al.*, *The EMBO J.*, (akzeptiert).

Dieses Phospholipidmolekül umwindet mit seinen beiden Fettsäureketten und seiner Inositolkopfgruppe einen Teil der Transmembranhelix des Rieske-Proteins und ist auf der anderen Seite im Kontakt mit der Transmembranhelix des Cytochrom c_1 und der Transmembranhelix E des Cytochrom b (siehe Abb.12). Aufgrund der speziellen Position zwischen den Transmembranhelices des Cytochrom b , des Cytochrom c_1 und des Rieske-Proteins wird dieses Phospholipid als "interhelikales" Lipid bezeichnet. Seine Phosphodiestergruppe bildet eine Ionenbrücke zu Lys272 des Cytochrom c_1 , das in mitochondriellem Cytochrom c_1 mit Ausnahme des Proteins aus *Neurospora crassa* voll konserviert ist (siehe Anhang). Desweiteren befindet sich die Phosphodiestergruppe in kurzer Distanz zu Ser73 des Rieske-Proteins. Der Inosit-Ring ist an der Interaktion mit dem umgebenen Protein über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken beteiligt. Die fünf Hydroxygruppen des Rings interagieren mit Glu76 und Ser80 des Rieske-Proteins und mit Asn74 des Cytochrom b . Zudem ist der Inosit-Ring über Wasser59 an Glu265 des Cytochrom c_1 gebunden. Wasser59 und Asn74 interagieren über Wasser438 mit Tyr76 des Cytochrom b . Die Fettsäureketten dieses Lipids erstrecken sich in den Zwischenraum zwischen hydrophoben Resten des Rieske-Proteins und des Cytochrom b . Fettsäurekette 1 interagiert mit Ala71 des Rieske-Proteins, Leu277 des Cytochrom c_1 und Lipid L2. Fettsäurekette 2 wechselwirkt mit Met237 des Cytochrom b .

3.1.4.3 Phospholipidbindung in der Region III

An der Kontaktfläche zwischen den Helices A, B und E des Cytochrom b , der Transmembranhelix des Cytochrom c_1 , der Untereinheit 7 und der Untereinheit 8 in der Region III, konnten zwei Lipide lokalisiert werden. Die Phosphodiestergruppe von Lipid L4 (siehe Abb.11E), das als Phosphatidylethanolamin (PE) identifiziert wurde, wird über die Aminosäurereste Tyr102 und Tyr103 des Cytochrom b ligandiert. Diese beiden Aminosäurereste sind in mitochondriellem Cytochrom b hochkonserviert (Degli Esposti et al. 1993). Die Ethanolamin-Gruppe steht mit Glu82 der Untereinheit 7 im Wasserstoffbrückenabstand und zeigt hydrophobe Interaktionen zu Arg51 der Untereinheit 8. Die Phosphodiestergruppe des Lipids interagiert über ein Wassermolekül

(Wat415) einerseits mit Trp29 des Cytochrom *b* und andererseits mit der Phosphodiestergruppe B des Lipids L5. Der Fettsäurerest 1 dieses Lipids besitzt einen deutlichen Knick und zeigt in eine hydrophobe Höhlung des Cytochrom *b*. Dort interagieren mehrere hydrophobe Aminosäureseitenketten des Cytochrom *b* (Ala98, Phe278, Phe326, Phe329, Phe333) mit dem Lipid. Die Fettsäurekette 2 interagiert mit Phe52 des Cytochrom *b*.

Unmittelbar neben Lipid L4 wurden mehrere weitere langgestreckte Elektronendichten beobachtet, die einem Cardiolipinmolekül (CL) zugeordnet werden konnte (siehe Abb.11F und Abb.13).

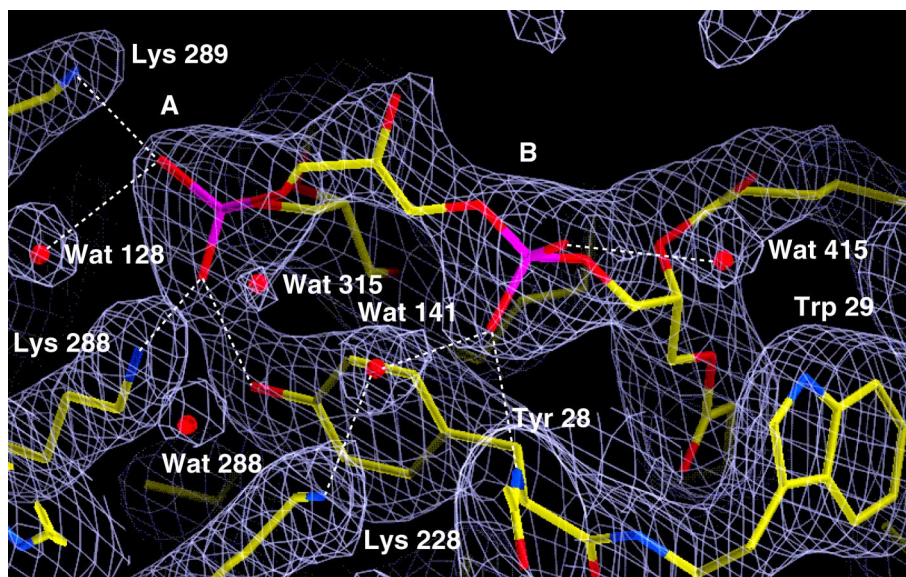


Abb. 13: Das gebundene Cardiolipin-Molekül in der Region III von der Matrixseite aus gesehen. Die Proteinreste, das Lipidmolekül und die Wassermoleküle sind mit der (2Fo-Fc)-Elektronendichte gezeigt. Die Abbildung stammt aus: Lange *et al.*, *The EMBO J.*, (akzeptiert).

Dieses Phospholipid ist mit einer seiner Phosphodiestergruppen (Gruppe A) an die Transmembranhelix des Cytochrom *c*₁ gebunden. Die Phosphodiestergruppe A wird von Lys288 und Lys289 des Cytochrom *c*₁ sowie von Tyr28 des Cytochrom *b* und Wasser128 koordiniert. Außerdem steht die Gruppe A in Wasserstoffbrückenabstand zu Wasser318, das mit Lys296 des Cytochrom *c*₁ und His85 der Untereinheit 7 interagiert. Wasser318 steht in Verbindung zu Wasser141, das in Wasserstoffbrückenabstand zu Lys228 des Cytochrom *b* steht. Eine weitere Interaktion besteht durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Estercarbonylgruppe der Fettsäure 1 und Tyr281 des Cytochrom *c*₁. Die

andere, ungebundene Phosphodiestergruppe (Gruppe B) des Cardiolipins zeigt in Richtung des Lipid 4. Diese Phosphodiestergruppe interagiert über Wasser⁴¹⁵ mit Lipid L4 und wird zudem von dem Peptidstickstoff des Tyr28 des Cytochrom *b* ligandiert. Zwischen den beiden Phospholipiden L4 und L5 liegt Trp29 des Cytochrom *b* in der Höhe der Fettsäureestergruppen. Hydrophobe Interaktionen bestehen zwischen der Fettsäure 1 der Phosphatidylgruppe B Resten des Cytochrom *b* (Met32, Met95, Thr232, Leu235 und Phe236) sowie der Fettsäurekette 1 der Phosphatidylgruppe A mit Val231 des Cytochrom *b*. Zudem existieren hydrophobe Interaktionen zwischen der Seitenkette des His85 der Untereinheit 7 und der verbrückenden Glyceringruppe des Lipids, sowie zwischen der Seitenkette des Tyr28 und der Phosphatidylgruppe A.

3.1.5 Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex in der Cardiolipin defizienten *S. cerevisiae*-Mutante *crd1*

Die *S. cerevisiae* Mutante *crd1* (FGY-2) von wurde von Prof. Miriam Greenberg (Wayne State University, Detroit, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Mutante hat einen blockierten Syntheseweg für Cardiolipin und produziert daher Mitochondrien, die frei von Cardiolipin sind (Jiang *et al.*, 2000; Koshkin & Greenberg, 2000; Schlame *et al.*, 2000). Die Untersuchung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus dieser Mutante sollte zeigen, welchen Einfluß Cardiolipin auf die strukturelle und funktionelle Integrität des Enzyms hat. Die Mutante und der Wildstamm (FGY-3) wurden bei bei der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig in YPGE Medium angezogen.

3.1.5.1 Bestimmung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes in Gesamtmembranen aus der *crd1*-Mutante

Untersuchungen an isolierten Membranen zeigten, daß sowohl die *crd1*-Mutante als auch der Wildtyp von *S. cerevisiae* Cytochrom-*bc*₁-Komplex enthalten. Durch Redoxdifferenzspektren von Membransuspensionen konnte festgestellt werden, daß die Mutante nur ca. 68 % des Cytochrom *b*-Gehaltes des Wildtyps besitzt. Der Gehalt der

Zellen an Cytochromen *c*, *b* und *a* wurde für beide Stämme von Dr. Brigit Meunier vom Wolfson-Institute in London bestimmt (siehe Tab.9).

Tab. 9: Gehalt an Cytochromen vom *c*-, *b*- und vom *a*-Typ in Zellen der *crd1*-Mutante und des Wildtyps in nmol pro g Zellen bestimmt durch Redoxdifferenzspektren an intakten Hefezellen.

Hefe-Stamm	Cytochrom <i>c</i> ₁ + <i>c</i>	Cytochrom <i>b</i>	Cytochrom <i>a</i> + <i>a</i> ₃
Wildtyp	19,4 nmol/g Zellen	6,0 nmol/g Zellen	1,39 nmol/g Zellen
Crd1-Mutante	14,6 nmol/g Zellen	5,7 nmol/g Zellen	0,36 nmol/g Zellen

Dabei zeigte sich, daß die *crd1*-Mutante ca. 95 % des Cytochrom *b* Gehaltes des Wildtyps besitzt. Der Gehalt der *c*-Typ Cytochrome in der *crd*-Mutante lag bei ca. 75 % des Wildtyps während die *crd*-Mutante nur ca. 25 % *a*-Typ Cytochrome besaß.

3.1.5.2 Untersuchung des isolierten Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus der *crd1*-Mutante

Die Reinigung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus der *crd1*-Mutante und dem Wildtyp erfolgte in beiden Fällen über die DEAE-FF-Sepharose-Säule. Der isolierte Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus den beiden Stämmen ist mittels Gelelektrophorese nicht unterscheidbar (siehe Abb. 14). Die Mutante enthält demnach alle Untereinheiten des Enzyms des Wildtyps. Die Untersuchung der Enzymaktivität bei pH 7,0 lieferte im Fall des Enzyms aus dem Wildstamm 61 s⁻¹, im Fall des Enzyms aus der Mutante eine Wechselzahl von 43 s⁻¹(siehe Tab.10).

Tab. 10: Vergleich der Cytochrom *b* Konzentration in den Membranen der beiden Hefestämme WT und *crd1delta* sowie Vergleich der Wechselzahlen der isolierten Enzyme.

Hefestamm	Cytochrom <i>b</i> in Membranen	Wechselzahl des isolierten Enzyms
WT (FGY-3)	197 pmol/mg Protein	61 s ⁻¹
<i>crd1delta</i> (FGY-2)	117 pmol/mg Protein	43 s ⁻¹

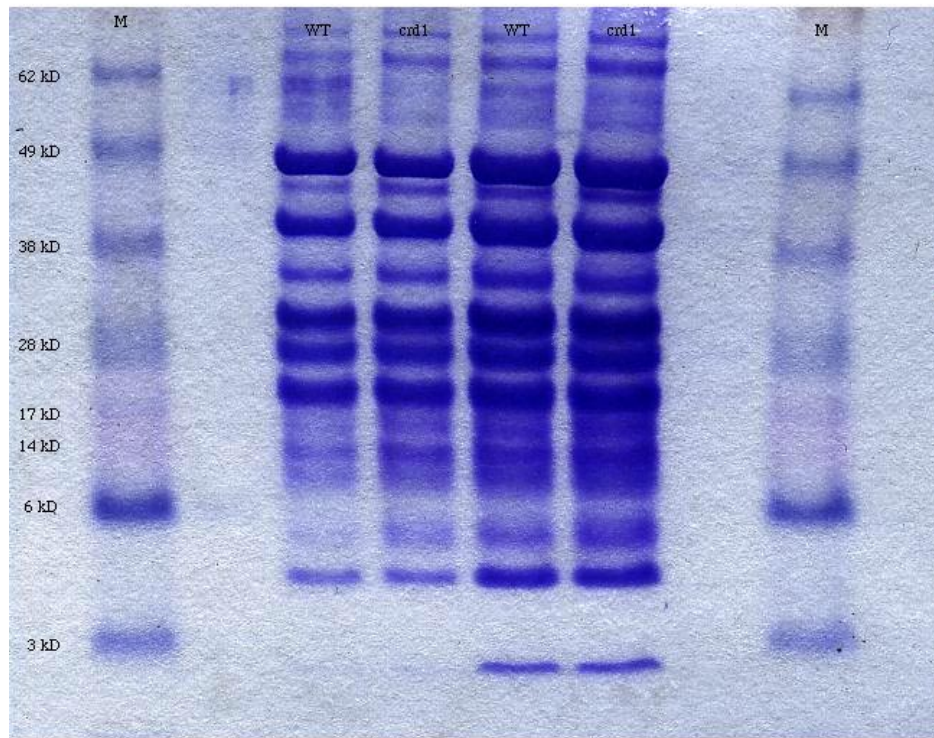


Abb. 14: SDS-Gelelektrophorese (4-12% Bis-Tris-Gel) des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae*. M= Marker, WT=Wildtyp, crd1=crd1-Mutante.

Wie die Struktur des Enzyms zeigt ist das gebundene Cardiolipin-Molekül nicht weit entfernt von der Q_i -Bindungsstelle und dem Häm b_H . Das Fehlen des Cardiolipins in der crd-Mutante könnte sich daher auf die Redox Eigenschaften des Häm b_H auswirken.

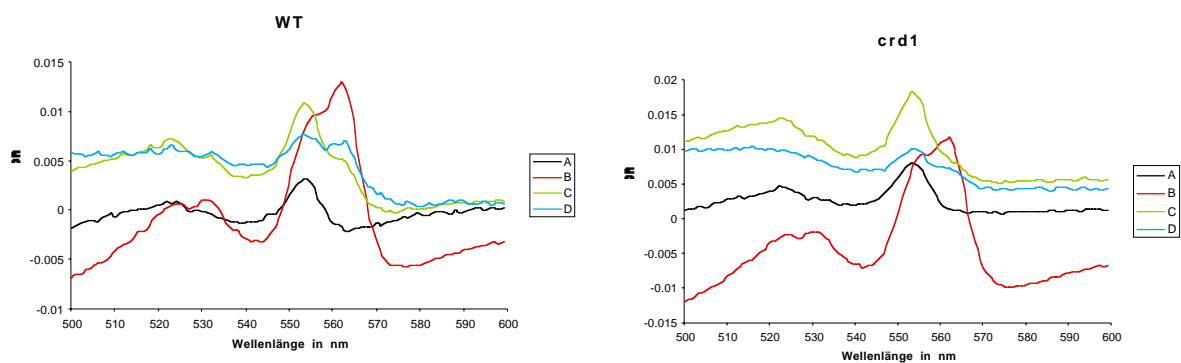


Abb. 15: Redoxdifferenz-Spektren des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus dem Wildtyp und aus der crd1-Mutante. A nativ-oxidiert, B voll reduziert-oxidiert, C reduziert (+Chinol)-oxidiert, D C-A.

Um dies zu prüfen wurde versucht, durch Inkubation des Enzyms mit überschüssigem Ubichinol in Abwesenheit von Cytochrom *c*, Unterschiede in der Reduzierbarkeit des Enzyms zu messen. Redoxdifferenz-Spektren im Wellenlängenbereich von 500-600 nm ergaben, daß im Enzym aus der Wildtyp-Membran mehr als doppelt soviel Cytochrom *b* (32,5 % im Vergleich zu 12,9 %) als im Enzym aus der *crd*-Mutante reduzierbar war (siehe Abb.15), während die Reduktion des Cytochrom *c*₁ nicht stark verschieden war (26,5 % im Vergleich zu 22,9 %). Beide Enzympräparationen hatten vergleichbare Redoxzustände. Das Enzym aus dem Wildtyp besaß zu 37,5 % vorreduziertes Cytochrom *c*₁ und zu 4 % vorreduziertes Cytochrom *b*. Das Enzym aus der *crd*-Mutante zeigte ein zu 39 % vorreduziertes Cytochrom *c*₁ und ein zu 2,3 % vorreduziertes Cytochrom *b*.

3.1.6 Untersuchung der gebundenen Phospholipide mittels ³¹P-Festkörper-NMR Spektroskopie

Für die Untersuchung der molekularen Umgebung von Phospholipiden in Membranproteinen bietet sich die ³¹P-NMR Spektroskopie an, da diese Spektroskopiemethode die Untersuchung von nicht derivatisierten Phospholipiden zuläßt. Mittels ³¹P-Festkörper-NMR-Spektroskopie an Proben des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes sollte in erster Linie die Ligandierung des gebundenen Cardiolipin-Moleküls untersucht werden. Ähnliche spektroskopische Messungen sind an Cardiolipin, das mit Cytochrom *c* interagiert durchgeführt worden (Pinheiro & Watts, 1994).

Proben des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wurden mittels "magic angle spinning" (MAS) ³¹P-Festkörper NMR-Spektroskopie untersucht. Die Messungen wurden von Dr. Robert Graf am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz an einem 700 MHz Spektrometer (Bruker) durchgeführt. Aufgrund der intensiven Signale des Phosphatpuffers, der bei der Proteinreinigung benutzt wurde, mußte das Protein mittels eines modifizierten Protokolls (Hanekop, 2000) gereinigt werden. Die Messungen sollten ursprünglich mit Kristallen des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes durchgeführt werden. Die ³¹P-NMR-Spektroskopie erfordert jedoch große Mengen an phosphatfreien Membranproteinkristallen, die nicht zur Verfügung gestellt werden konnten. Deshalb

wurden die Messungen mit hochkonzentrierten, viskosen Lösungen des Proteins in phosphatfreiem Puffer durchgeführt. Dazu wurden Proben aus der ersten (DEAE-FF) und aus der zweiten (DEAE-HyperD) Proteinreinigungstufe benutzt.

Das Festkörper NMR-Spektrum des Cytochrom- bc_1 -Komplexes nach der zweiten Reinigungsstufe zeigt ^{31}P -Signale in drei unterscheidbaren Bereichen der chemischen Verschiebung (siehe Abb. 16).

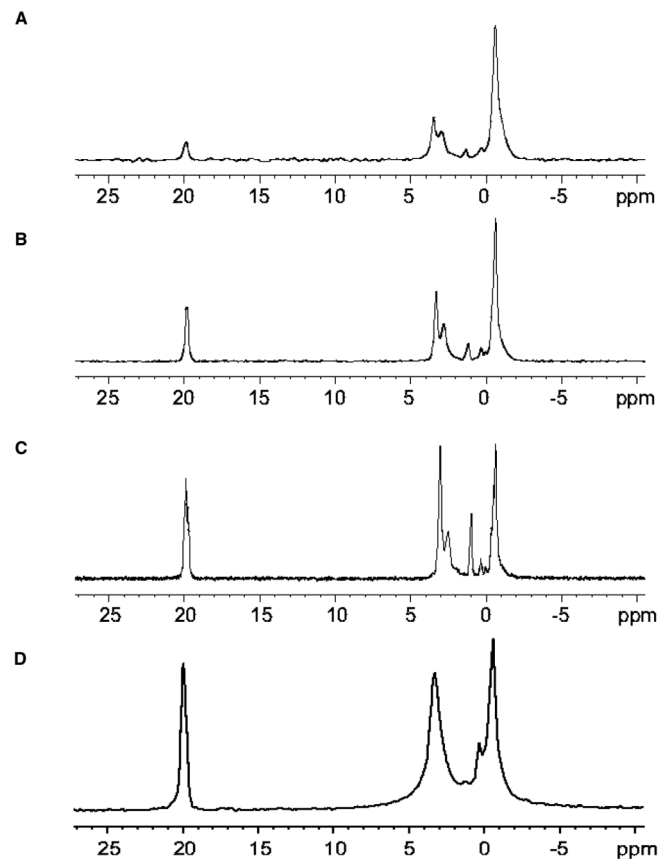


Abb. 16: ^{31}P Festkörper-NMR Spektrum des Cytochrom- bc_1 -Komplexes nach der ersten Proteinreinigungsstufe (DEAE-FF-Sepahrose; A, B, C) nach unterschiedlichen Meßzeiten (B: 4 Stunden nach A, C: 24 Stunden nach A). D zeigt die Probe nach der zweiten Reinigungsstufe (DEAE-HyperD).

Signale zwischen -1 und +1 ppm, Signale zwischen 2,5 und 4 ppm und ein Signal bei etwa 20 ppm. Die Signale waren jedoch zeitlich nicht konstant. Die Messungen im Abstand von 24 Stunden ergaben NMR-Spektren mit vergleichbaren Werten für die chemische Verschiebung, jedoch waren die Signale bei 20 ppm und zwischen 2,5 und 4 ppm im Vergleich zu den Signalen zwischen -1 und +1 ppm weniger intensiv. Die

Interpretation der Signallagen ist sehr problematisch. Bisher liegen keine vergleichbaren Untersuchungen an gebundenen Phospholipiden in Membranproteinproben vor. Eine mögliche Erklärung für die ungewöhnlichen Signallagen sind Effekte, die durch paramagnetische Zentren im Protein verursacht werden. Solche paramagnetischen Effekte können in der Festkörper-NMR-Spektroskopie zu stark verschobenen Signallagen führen (Dr. Robert Graf, persönliche Mitteilung). Interessanterweise sind für Cardiolipin, das mit Cytochrom *c* wechselwirkt ähnlich verschobene Signallagen gefunden worden (Pinheiro & Watts, 1994). Daher ist es möglich, daß die Signale aus dem Bereich außerhalb von -1 bis +1 ppm von Phospholipiden stammen, die sich in der Nähe eines paramagnetischen Zentrums befinden.

Die Untersuchung der gebundenen Phospholipide mittels Festkörper-NMR Spektroskopie ergab Signale mit zum Teil sehr ungewöhnlichen Werten für die chemische Verschiebung. Die Interpretation dieser Signalverschiebungen von einem Bereich, der typisch für Membranphospholipide ist, wird dadurch erschwert, daß die Lipidbindungsstellen in der Nähe von paramagnetischen Redoxzentren liegen. Die zeitliche Veränderung der Intensitäten der ^{31}P -Signale könnte durch Annahme einer partiellen Denaturierung des Enzyms während der Messung erklärt werden. Einerseits wurde die Enzymprobe bei der Messung auf eine Rotationsfrequenz von 4 kHz beschleunigt, andererseits wurde die Temperatur während der Messung nicht kontrolliert. Durch den Druckluftantrieb des MAS-Rotors sollte sich eine Temperatur von etwa 10°C einstellen. Durch die partielle Denaturierung könnten die spezifischen Bindungsstellen zum Teil zerstört werden, wonach die freigesetzten Lipide in die Detergensemizelle integriert werden könnten. Diese solubilisierten Phospholipide könnten dann Signale bei chemischen Verschiebungen im Bereich von -1 bis +1 ppm zeigen.

3.2 Bestimmung der Struktur des Redoxkomplexes aus Cytochrom-*bc*₁-Komplex und Cytochrom *c*

Kokristallisationsexperimente des Cytochrom *c* mit seinen Redoxpartnern sind in der Literatur beschrieben worden (Adir *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1994, Pelletier & Kraut, 1992, Poulos *et al.*, 1987). Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Bos taurus* ist mit

Cytochrom *c* aus *Bos taurus* kokristallisiert worden (Yu *et al.*, 1996) jedoch wurden keine Strukturdaten veröffentlicht. Es gelang den Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *S. cerevisiae* mit seinem gebundenen Redoxsubstrat Cytochrom *c* zu kristallisieren.

Erste Kokristallisationsexperimente wurden mit Cytochrom *c* aus Pferd vorgenommen. Es folgten weitere Kokristallisationsexperimente mit dem iso-1 Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae*. Für die Strukturlösung wurden die Koordinaten 1EZV für den Cytochrom-*bc*₁-Komplex und 1YCC für iso-1 Cytochrom *c* verwendet. Die Nummerierung der Aminosäuren im Cytochrom *c* erfolgt nach der Nummerierung für Cytochrom *c* aus Säugetieren.

3.2.1 Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes mit Cytochrom *c*

Für die Kokristallisation wurde gekauftes Cytochrom *c* aus Pferd und aus *S. cerevisiae* verwendet. Iso-1 Cytochrom *c* besitzt ein Cystein nahe des C-Terminus (Cys 102). Dieser solvensexponierte Aminosäurerest führt unter nichtreduzierenden Bedingungen zur Dimerisierung des Cytochrom *c* (Moench & Satterlee, 1995). Die dadurch bedingte Heterogenität ist für ein Kristallisationsexperiment problematisch. Zur Kristallisation mit dem Hefe Cytochrom *c* mußte Cys102 mit einer Schutzgruppe blockiert werden. Hierfür wurden als Schutzgruppen Europium-Iodacetamido-Chelat (Eu) oder Methylmethanthiosulfonat (MMTS) (Busse *et al.*, 1990) verwendet. Die Bildung der Proteinkristalle erfolgte sehr schnell. Häufig waren schon 20 Minuten nach dem Mischen die ersten Kristalle unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Daher war die Bildung der Proteinkristalle vermutlich nicht durch die Dampfdiffusion gesteuert.

3.2.1.1 Auswahl der Ionenstärke für die Kokristallisation

Zur Auswahl der Ionenstärke für die Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes mit Cytochrom *c* wurde die Bindung des Enzyms an immobilisiertes Cytochrom *c* (Azzi *et al.*, 1982) in Abhängigkeit von der Ionenstärke untersucht. Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex wurde an das immobilisierte Cytochrom *c* bei einer Ionenstärke von 40 mM gebunden. Das Enzym wurde dann schrittweise in einem Experiment mit Elutionspuffern

bestimmter Ionenstärke (von 60 bis 360 mM) von der Säule eluiert. Durch Messung der Extinktion bei 415 nm wurde die Konzentration des Cytochrom- bc_1 -Komplex im Eluat bestimmt. Das Elutionsprofil (siehe Abb.17) zeigt ein Maximum der Enzymkonzentration bei einer Ionenstärke von 120 mM.

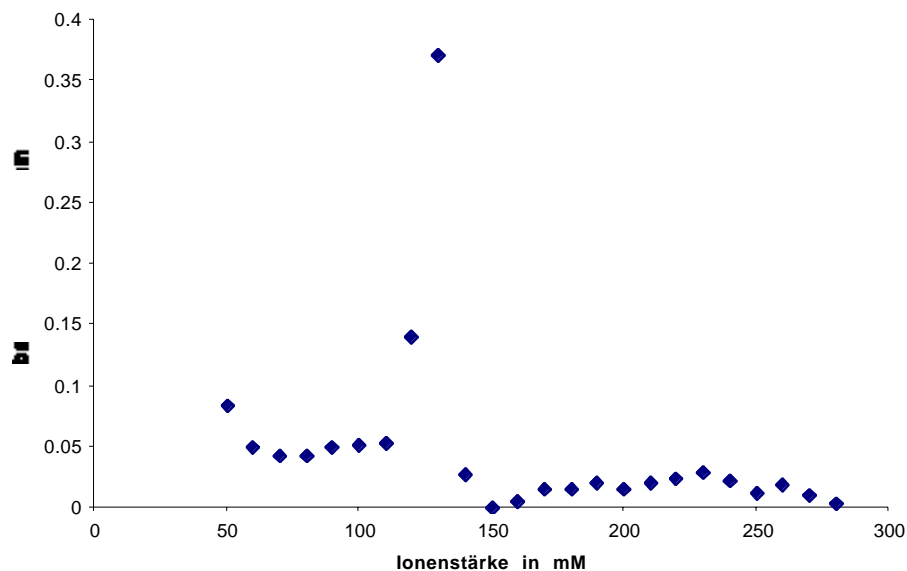


Abb. 17: Schrittweise Elution des Cytochrom- bc_1 -Komplexes von der Cytochrom- c -Affinitätssäule.

Mit beiden Cytochrom c , sowohl aus *S. cerevisiae* als auch aus Pferd, zeigt das Enzym einen leichten Anstieg der Aktivität im Bereich von 20 bis 100 mM Ionenstärke (siehe Abb.18). Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke zeigt die Enzymaktivität ein Maximum bei etwa 160 mM für Cytochrom c aus *S. cerevisiae* und bei etwa 120 mM für Pferd. Bei weiter ansteigender Ionenstärke fällt die Enzymaktivität im Falle des Cytochrom c aus *S. cerevisiae* leicht, im Falle des Cytochrom c aus Pferd stark ab. Solche Kurven mit einem Maximum der Enzymaktivität bei einer moderaten Ionenstärke sind charakteristisch für Proteine, die stabile Redoxkomplexe bilden (Watkins *et al.*, 1994). Ein entsprechendes Verhalten findet man auch bei der Oxidation von Cytochrom c durch die Cytochrom- c -Oxidase (Hazzard *et al.*, 1991) und bei der Reduktion von Plastocyanin durch Cytochrom f (Meyer *et al.*, 1993).

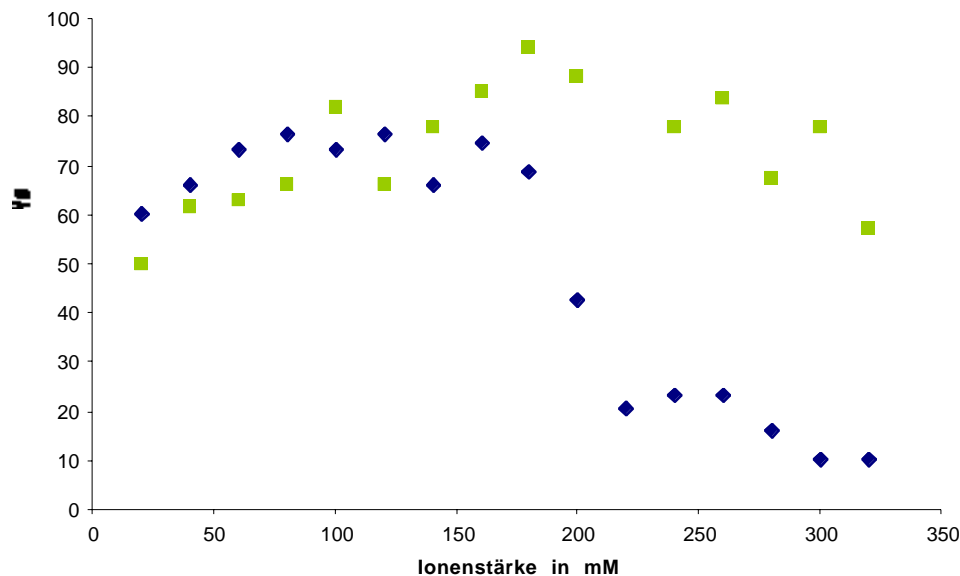


Abb. 18: Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die enzymatische Aktivität des Cytochrom- bc_1 -Komplexes. Blau: Cytochrom c aus Pferd, Grün: Cytochrom c , iso-1 aus *S. cerevisiae*.

Die Breite des Kurvenanstiegs bei niedriger Ionenstärke ist ein Maß für die Stärke des gebildeten Komplexes, die Höhe dieses Kurvenast ist ein Maß für die Reorientierung der Komplexpartner für den optimalen Elektronen-Transfer. Der Kurvenast bei hoher Ionenstärke wird hauptsächlich durch ionische Wechselwirkungen beeinflusst (Watkins *et al.*, 1994). Die Kinetik der Reduktion des Cytochrom c durch den Cytochrom- bc_1 -Komplex zeigt im Bereich niedriger Ionenstärke für beide Cytochrome c einen leichten Anstieg. Der Anstieg ist jedoch im Falle des Cytochrom c aus *S. cerevisiae* länger als im Falle des Cytochrom c aus Pferd. Die Abnahme der Enzymaktivität im Bereich hoher Ionenstärke ist für Cytochrom c aus Pferd wesentlich deutlicher ausgeprägt als für Cytochrom c aus *S. cerevisiae*. Im Komplex mit Cytochrom c aus Pferd scheinen daher ionische Wechselwirkungen eine größere Rolle zu spielen als im physiologisch relevanten Komplex mit Cytochrom c aus *S. cerevisiae*. Weiterhin scheint eine Umorientierung des Cytochrom c bei der Reduktion durch den Cytochrom- bc_1 -Komplex keine große Rolle zu spielen. Für die Kokristallisation wurde eine Ionenstärke von 120

mM benutzt, da diese im physiologischen Bereich der Ionenstärke von 100-150 mM liegt (Tian *et al.*, 2000).

3.2.1.2 Auswahl des pH-Wertes für die Kokristallisation

Die Kokristallisationsexperimente mit Cytochrom *c* aus Pferd wurden unter den Bedingungen der Kristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes (Hunte *et al.*, 2000) bei pH 8,0 vorgenommen. Bei der Kristallisationstemperatur von 4°C entspricht dies einem pH Wert von 8,6. Die Kokristallisation mit Cytochrom *c* aus Hefe, das mit Eu-Marker derivatisiert war, wurde unter identischen Bedingungen vorgenommen.

Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* ist bei Blockierung des Cys102 mit einer großen Schutzgruppe bei pH-Werten über 8,5 konformativ nicht mehr stabil (Moench & Satterlee, 1995). Daher wurde zur Verbesserung der Kokristallisation der pH-Wert auf 7,5 bei 4°C gesenkt. Dies ist nahe des optimalen pH-Wertes für die enzymatische Aktivität des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae* (Brandt & Okun, 1997).

3.2.2 Kristallographische Daten der Kokristallisationsansätze mit Cytochrom *c*

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der kristallographischen Daten der verschiedenen Kokristallisationsansätze mit Cytochrom *c*. Die Kristalle gehören alle der Raumgruppe P21 an. Mit Cytochrom *c* aus Pferd wurden zusätzlich auch Kristalle der Raumgruppe C2 erhalten.

Tab. 11: Datensätze der Kokristalle aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom *c*. Die Daten wurden gemessen an der Beamline ID14/3 am ESRF in Grenoble (2) bzw. an der X11 am DESY in Hamburg (1).

Cytochrom <i>c</i>	a in Å	b in Å	c in Å	β in °	Vollst. in %	Aufl. in Å	R_{sym} in %
Pferd (C2) ²	213,41	162,07	146,03	117,35	83,2	30-3,00	8,6
Pferd (P21) ¹	146,77	163,86	196,13	75,81	90,8	30-3,35	7,5
Hefe-Eu ²	147,47	166,12	195,60	104,09	95,2	30-3,65	12,1
Hefe-MMTS ²	147,22	165,53	195,89	104,19	92,8	30-2,97	10,6

3.2.2.1 Strukturlösung durch molekularen Ersatz

Die Strukturlösung wurde durchgeföhrt durch molekularen Ersatz unter Verwendung des Programmes AMORE (Navazza, 1994). Als Suchmodell wurde die Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes bei 2,3 Å ohne Wassermoleküle und ohne Conezym Q_6 benutzt (Hunte et al., 2000). Als Ergebnis wurden zwei gleiche Lösungen erhalten. Das Enzymdimer befindet sich in der asymmetrischen Einheitszelle.

3.2.2.2 Verfeinerung der Strukturen

Zur Verbesserung der Positionierung erfolgte die Verfeinerung der Strukturen mit dem sog. "rigid-body" Verfahren. Hierbei wurden die zwei Monomere des Homodimers als zwei separate starre Körper behandelt. Die Verfeinerung mit diesem Verfahren und die anschließende Positionsverfeinerung lieferte die in Tabelle 12 aufgeführten Werte.

Tab. 12: Verfeinerungsstatistik der Datensätze der Kokristalle.

Cytochrom <i>c</i>	R-Faktor	freier R-Faktor
Pferd	24,3 %	29,1 %
Hefe-Eu	22,8 %	27,8 %
Hefe-MMTS	22,8 %	26,7 %

3.2.3 Die Struktur des Redoxkomplexes aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom c

Obwohl für alle aufgeführten Kokristall-Datensätze eine Lösung für den molekularen Ersatz erhalten wurde konnte die Struktur des Redoxkomplexes aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom c konnte nur mit Hilfe des Hefe-MMTS Datensatzes bestimmt werden. Mit diesen Daten war es möglich nach der "rigid-body"-Verfeinerung eine eindeutige Elektronendichte für Cytochrom c zu erhalten.

3.2.3.1 Verfeinerung der Struktur

Die Verfeinerung der Struktur erfolgte mit einem weiteren Schritt des sog. "rigid-body"-Verfahrens. Zu Beginn wurden drei Verfeinerungszyklen berechnet, bei denen die beiden Enzymmonomere als separate starre Körper verwendet wurden. Dies resultierte in einem R-Faktor von 30,8 % und einem freien R-Faktor von 31,2 %. Die danach berechnete 2Fo-Fc-Elektronendichte erlaubte die manuelle Positionierung eines Moleküls Cytochrom c über einem der Enzymmonomere (MonomerB). Danach wurden erneut drei Zyklen der "rigid-body"-Verfeinerung gerechnet, bei denen Cytochrom c als zusätzlicher dritter starrer Körper eingesetzt wurde. Dies resultierte in einem R-Faktor von 27,8 % und einem freien R-Faktor von 28,0 %. Das Modell des Cytochrom c wurde zusätzlich mit Hilfe des Programms O (Jones *et al.*, 1991) dort manuell der Elektronendichte angepaßt wo die Polypeptidkette oder die Seitenketten der Aminosäuren nicht genau in die Elektronendichte passte. So mußte beispielsweise der Bereich Gly23, Gly24, Pro25 korrigiert werden. Anschließend folgte die Positionsverfeinerung sowie eine Verfeinerung der individuellen Temperaturfaktoren und resultierte in einem R-Faktor von 22,8 % und einem freien R-Faktor von 26,7 %. Die Verfeinerungsschritte mit dem Modell, das Cytochrom c enthielt wurden mit dem sogenannten "solvent flattening"-Modus gerechnet.

3.2.3.2 Kristallpackung

Abb. 19 zeigt die Kristallpackung des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit gebundenem Cytochrom c .

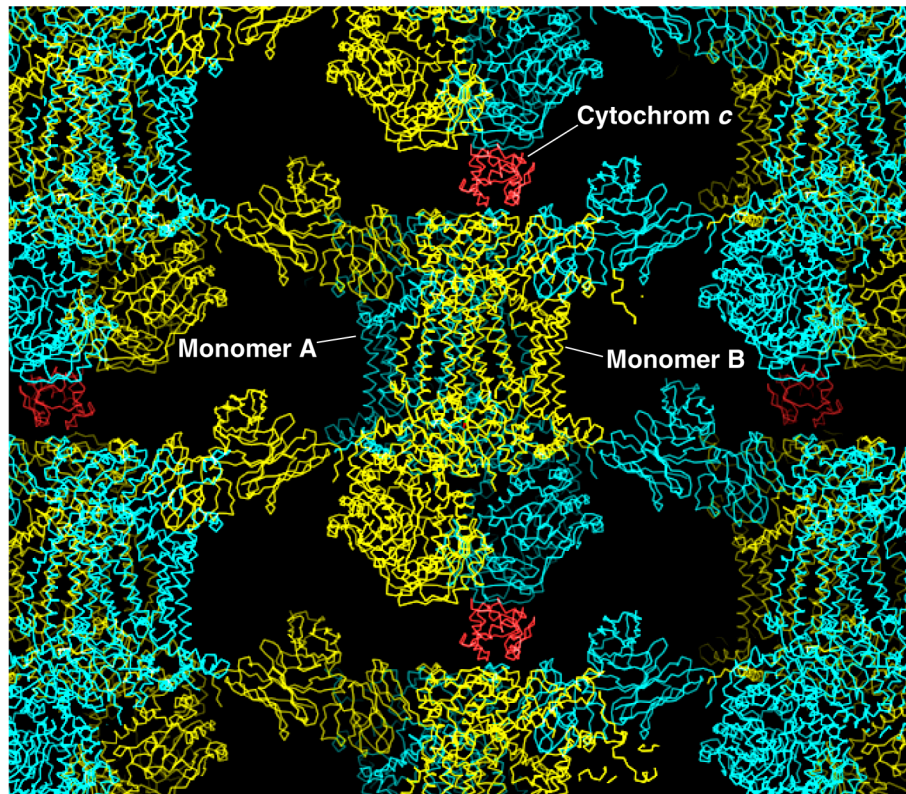


Abb. 19: Kristallpackung in den Kokristallen aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom c (MMTS). Dargestellt sind Cytochrom c (rot), Monomer B (blau) und Monomer A (gelb) mit ihren Polypeptidketten.

Cytochrom c befindet sich in einem freien Raum, der durch das Cytochrom c_1 und die Core-Proteine der benachbarten Enzymdimere in der Packung gebildet wird. Der kürzeste Abstand vom Cytochrom c zum benachbarten Enzymdimer ist zwischen His 39 von Cytochrom c und dem Peptidsauerstoff von Asp366 des Core-Proteins 2 (3,5 Å) zu finden. Der Abstand zwischen den beiden Aminosäureresten ist ausreichend für eine schwache Wasserstoffbrücke. Die Elektronendichte für den Imidazolring des His39 erlaubt jedoch keine eindeutige Orientierung der Ringebene. Daher kann eine Wasserstoffbrücke zu Asp366 nicht festgestellt werden. Der N-Terminus von Cytochrom c befindet sich ebenfalls in der Nähe des Core-Proteins 1. Der Abstand zwischen Glu-4 des Cytochrom c und Lys 310 des Core-Proteins 1 könnte für eine schwache

Wasserstoffbrücke ausreichen. Jedoch erlaubt die Elektronendichte des N-Terminus des Cytochrom *c* keine eindeutige Orientierung der Seitenketten. Dies wurde auch in der Hochauflösungs-Struktur des Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* beobachtet (Louie & Brayer, 1990). Insgesamt kann daher die Beteiligung des Cytochrom *c* an der Kristallpackung ausgeschlossen werden.

3.2.3.3 Orientierung der Häm-Gruppen von Cytochrom c_1 und Cytochrom *c*

Im Komplex ist das Cytochrom *c* an Cytochrom c_1 gebunden. Die Häm-Gruppen der beiden Cytochrome sind so orientiert, daß deren C-Pyrrolringe aufeinanderzuweisen (siehe Abb.20). Der Interplanarwinkel zwischen den beiden Porphyrinringebenen beträgt ca. 55° .

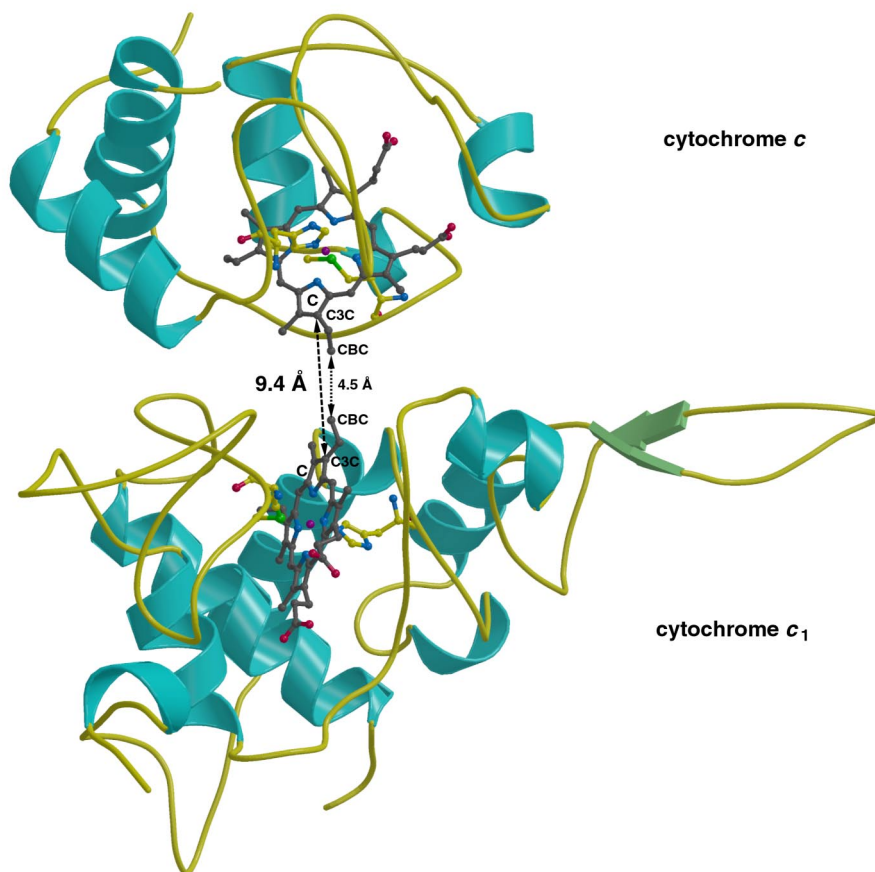


Abb. 20: Orientierung der Häm-Gruppen von Cytochrom c_1 (unten) und Cytochrom *c* (oben) im Komplex. Die Abbildung stammt aus Lange & Hunte, *PNAS*, (eingereicht).

Der kürzeste Abstand zwischen beiden Redoxgruppen ist der zwischen den CBC-Atomen der Vinylgruppen und beträgt 4,5 Å. Der Kante zu Kante Abstand (*edge-to-edge distance*) der beiden Häme beträgt 9,4 Å, der Abstand der beiden Eisen-Zentren ist 17,4 Å.

3.2.3.4 Intermolekulare Wechselwirkungen im Komplex

Die wechselwirkenden Aminosäurereste zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c liegen in unmittelbarer Umgebung der beiden Häm-Bindungstaschen (siehe Tab.13).

Tab. 13: Übersicht der Interaktionen zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c .

Cytochrom c_1	Cytochrom c	Distanz in Å
Häm c_1 Fe	Häm c Fe	17,4
Häm c_1 CBC	Häm c CBC	4,5
Ala 103 CB	Ala 81 CB	3,4
Phe 230 CD1	Arg 13 CD	3,6
Phe 230 CD1	Arg 13 NE	3,3
Phe 230 CE1	Arg 13 CG	3,8
Phe 230 CE1	Arg 13 CD	3,8
Phe 230 CE1	Arg 13 NE	3,8
Phe 230 CG	Arg 13 NE	4,0
Phe 230 CG	Arg 13 CD	4,0
Phe 230 CZ	Arg 13 CG	4,0
Phe 230 CZ	Thr 12 O	3,3
Met 233 CE	Arg 13 NH2	3,8
Ala 168 O	Val 28 CG1	4,0
Glu 235 OE2	Lys 86 NZ	3,3
Ala 164 O	Lys 79 NZ	3,8

Ala81 von Cytochrom c ist in kurzem van-der-Waals Abstand zu Ala103 von Cytochrom c_1 . Arg13 von Cytochrom c interagiert mit Phe 230 von Cytochrom c_1 in Form einer Stapelinteraktion. Die Guanidiniumgruppe des Arginins liegt dabei fast parallel zum Aromatenring des Phenylalanins. Solche Stapelinteraktionen sind von anderen Enzym-

Substrat-Komplexen bekannt (Flocco & Mowbay, 1994). Met233 des Cytochrom c_1 interagiert ebenfalls mit Arg13 des Cytochrom c . Weiterhin existiert eine schwache Wechselwirkung zwischen Ala168 und Val28. Zwei Interaktionen von Lysinresten des Cytochrom c existieren. Die Seitenkette des Lys79 interagiert mit dem Peptidsauerstoff des Ala164, die Seitenkette des Lys86 ist im Wasserstoffbrückenabstand zur Carboxygruppe des Glu235. Letztere Wechselwirkung ist die einzige Interaktion zwischen einem basischen Rest des Cytochrom c mit einem sauren Rest des Cytochrom c_1 .

3.2.3.5 Eigenschaften der Interaktionsfläche zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c

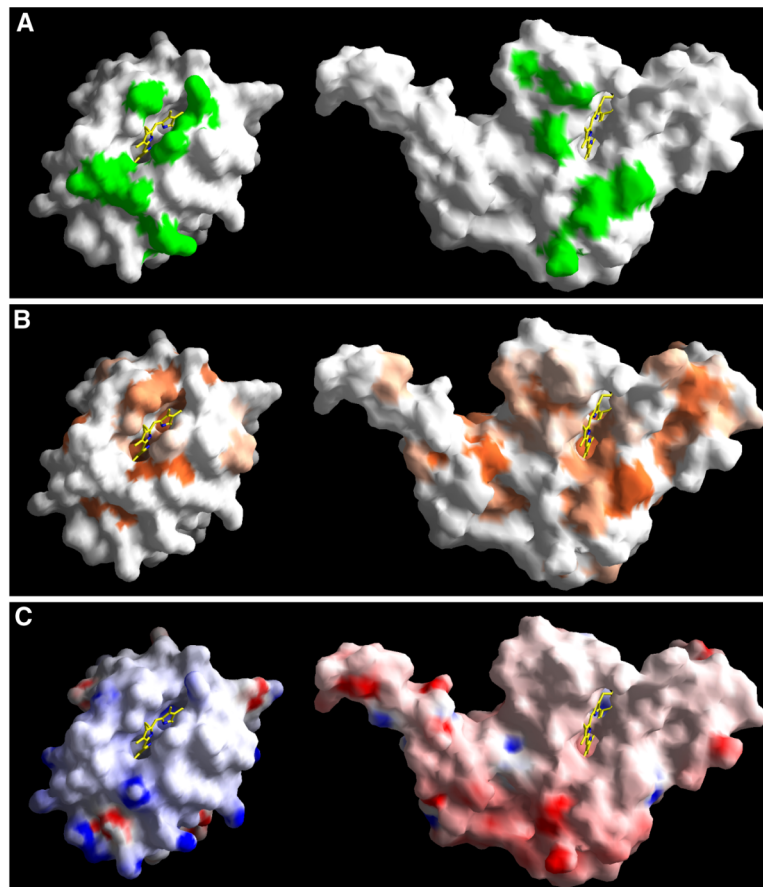


Abb. 21: Oberflächendarstellung der Interaktionsfläche von Cytochrom c_1 und Cytochrom c im Komplex. **A:** Aminosäurereste, die an Interaktionen beteiligt sind (grün), **B:** Darstellung von hydrophoben

Aminosäureresten (orange), C: Darstellung von positiven Ladungen (blau) und negativen Ladungen (rot). Die Abbildung stammt aus Lange & Hunte, *PNAS*, (eingereicht).

Die Interaktionsfläche zwischen beiden Cytochromen im Komplex hat eine trapezartige Form (siehe Abb. 21A) und umgibt die zentrale Häm-Spalte in beiden Cytochromen. Die Aminosäurereste der Interaktionsfläche sind überwiegend hydrophober Natur (siehe Abb. 21B). Geladene Aminosäurereste finden sich bei beiden Cytochromen vor allem außerhalb der Interaktionsfläche (siehe Abb. 21C).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von mitochondrialem Cytochrom c_1 und Cytochrom c zeigt, daß nur zwei der Interaktionen durch konservierte Aminosäurereste (Ala164/Lys79, Glu235/Lys86) zustande kommen (siehe Anhang). Interessanterweise werden die hydrophoben Interaktionen im Komplex alle durch nicht-konservierte Aminosäurereste der beiden Redoxpartner gebildet. Für den schnellen Transfer von Elektronen müssen Proteinkomplexe kleine Interaktionsflächen aufweisen. Der Komplex aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom c hat eine Interaktionsfläche von 880 Å² (siehe Tab.14). Zum Vergleich wurde für den Komplex aus Cytochrom- c -Peroxidase und Cytochrom c aus *S. cerevisiae* (Pelletier & Kraut, 1992) wurde eine Interaktionsfläche von 1150 Å² und für den Komplex aus Cytochrom f und Plastocyanin (Ubbink *et al.*, 1998) eine Interaktionsfläche von 1698 Å² bestimmt. Untersuchungen an Protein-Protein-Komplexen haben gezeigt, daß deren mittlere Interaktionsfläche ca. 1600 Å² groß ist (Lo Conte *et al.*, 1993).

Der polare Anteil an der Interaktionsfläche beträgt bei dem Komplex aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Cytochrom c 36 %, während die Interaktionsfläche des Komplexes aus Cytochrom c Peroxidase und Cytochrom c zu 46 % polar ist und die Interaktionsfläche im Komplex aus Cytochrom f und Plastocyanin 44 % polaren Anteil besitzt.

Tab. 14: Größe der Interaktionsflächen und deren polarer Anteil im Redoxkomplex aus Cytochrom- bc_1 -Komplex (Cyt bc_1) und Cytochrom c (Cyt c). Zum Vergleich sind die Daten für die Komplexe aus Cytochrom- c -Peroxidase (Ccp) und Cytochrom c sowie aus Cytochrom f und Plastocyanin (Pcn) dargestellt.

Komplex	Fläche in Å ²	Polarität in %
Cyt bc_1 - Cyt c	880	36
CcP-Cyt c	1150	46
Cyt f - Pcn	1698	44

3.2.3.6 Strukturelle Unterschiede der beiden Monomere im Enzymdimer

In der 2,3 Å Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes sind die beiden Monomere eines Dimers ununterscheidbar, da durch das Enzymdimer eine kristallographische C2-Symmetrieachse verläuft. Die asymmetrische Einheit enthält nur eines der beiden Monomere. Bei der 2,97 Å Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit gebundenem Cytochrom c befindet sich das Dimer in der asymmetrischen Einheit. Daher sind beide Monomere strukturell unterscheidbar. Das Monomer mit gebundenem Cytochrom c wird im Folgenden Monomer B genannt, das andere Monomer A.

3.2.3.7 Bindung des Cytochrom c an den homodimeren Cytochrom- bc_1 -Komplex

Die Elektronendichte, die nach dem molekularen Ersatz und der anschließenden Verfeinerung erhalten wurde, erlaubte die Positionierung von nur einem Molekül Cytochrom c an eine der zwei Bindungsstellen im homodimeren Enzym. Über dem Cytochrom c_1 im Monomer B konnte ausgeprägte Elektronendichte für Häm c und die benachbarte Helix 4 sowie für weitere helikale Bereiche des Cytochrom c gefunden werden. In Monomer A konnte jedoch an der äquivalenten Position nur sehr

3.2.3.8 Strukturunterschiede an der Ubichinon-Reduktionsstelle (Q_i-Bindungsstelle)

Abb. 22: Darstellung der Elektronendichte in den beiden Ubichinon-Reduktionsstellen (Q_i-Bindungsstellen) im homodimeren Cytochrom-*bc*₁-Komplex in den Kokristallen mit Cytochrom *c* (MMTS). Die Abbildung stammt aus Lange & Hunte, *PNAS*, (eingereicht). Blau: 2Fo-Fc-Elektronendichte, grün: Fo-Fc-Elektronendichte

Die nach der Verfeinerung der Struktur berechneten Elektronendichtekarten zeigen unterschiedlich deutliche Elektronendichte für das gebundene Ubichinon (siehe Abb.22). Während in der Q_i -Bindungsstelle des Monomers A nur fragmentarische Dichte für die Benzochinongruppe des Ubichinons zu sehen war, zeigte sich in der Q_i -Bindungsstelle des Monomers B deutliche Elektronendichte für die Benzochinongruppe sowie den nächsten Isoprenoidrest des Chinons. Weitere unterbrochene Elektronendichte zeigte sich, in beiden Monomeren etwa gleich, an den Positionen, auf denen in der 2,3 Å Struktur die Isoprenoidkette des Ubichinons zu liegen kommt.

3.2.3.9 Kinetik des Elektronentransfers zwischen Cytochrom c_1 und Cytochrom c

Die Hämgruppen der beiden Cytochrome kommen sich im Komplex sehr nahe. Beide Häm-Kanten sind im Komplex für Wasser erreichbar. Die Orientierung der beiden Redox-Kofaktoren erlaubt einen direkten Elektronentransfer vom Cytochrom c_1 zu Cytochrom c ohne die Beteiligung von Proteinresten. Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers wurde auf der Basis des Modells von Dutton und Mitarbeitern (Page *et al.*, 1999) berechnet. Der Abstand der beiden Häm-Kanten (*edge-to-edge distance*) im Komplex beträgt 9,4 Å und die Packungsdichte zwischen Donor und Akzeptor ρ ist 0,65. Daraus wurde eine Geschwindigkeitskonstante für den aktivierungsfreien Elektronentransfer von $1,2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Das Mittelpunktspotential beider Cytochrome liegt bei 270 mV (T'sai & Palmer, 1983, Cutler *et al.*, 1987). Die Änderung der freien Reaktionsenthalpie ΔG_R für den Redoxprozeß ist deshalb null. Mit einem Wert für die Reorganisationsenergie zwischen $\lambda=0,7\text{eV}$ und $\lambda=1,0\text{eV}$ liegt die Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer zwischen $8,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ und $9,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$.

3.2.3.10 Kinetik des Elektronentransfers im Cytochrom- bc_1 -Komplex

Die Kinetik des Elektronentransfers im Cytochrom- bc_1 -Komplex wurde anhand des sog. "uniform barrier" Modells von Dutton und Mitarbeitern untersucht. Das Strukturmodell des Enzyms aus dem MMTS-Datensatz lieferte dafür die Positionen der Redox-Kofaktoren, sowie die Positionen der zwischen ihnen liegenden Proteinresten. Tabelle 14 zeigt die sog. Kante zu Kante (*edge-to-edge*) Distanzen für die einzelnen Redox-Kofaktoren im Homodimer, die sog. Packungsdichte ρ , die logarithmierten Werte für die Raten des aktivierungsenergiefreien Elektronentransfers $\log k^*$ sowie die Raten für den Elektronen-Transfer. Die Mittelpunktspotentiale für das Eisen-Schwefel-Zentrum, das Häm c_1 , das Häm b_L und das Häm b_H betragen 285 mV, 270 mV, -20 mV und 145 mV, die Mittelpunktspotentiale für die Redoxpaare Q_6/Q_6^- und für Q_6^-/Q_6H_2 liegen bei 110 mV und 199 mV (T'ai & Palmer, 1983, Kauten *et al.*, 1987). Für die Reorganisationsenergie wurden Werte von $\lambda=0,7\text{eV}$ und $\lambda=1,0\text{eV}$ angenommen (Page *et al.*, 1999).

Tab. 15: Übersicht der berechneten Parameter für den Elektronentransfer im Cytochrom- bc_1 -Komplex. k^* ist die Rate des Elektronen-Transfers im Falle einer Kompensation von Reorganisationsenergie und freier Reaktionsenthalpie.

Donor-Akzeptor-Paar	edge-to-edge Distanz in Å	Packungs-dichte ρ	$\log k^*$	Rate des Elektron Transfers in s^{-1}
b_H-Q_6/Q_6^-	5,13	0,61	11,903	$2,3 \cdot 10^9 - 2,7 \cdot 10^8 s^{-1}$
$Q_6^-/Q_6H_2-FeS(b)$	6,74	0,77	11,182	$3,3 \cdot 10^9 - 3,9 \cdot 10^8 s^{-1}$
c_1-c	9,35	0,65	9,087	$8,3 \cdot 10^6 - 9,7 \cdot 10^5 s^{-1}$
b_L-b_H	12,5	0,77	7,795	$3,4 \cdot 10^6 - 4,3 \cdot 10^5 s^{-1}$
$Q_6/Q_6^-b_L$	11,1	0,59	7,553	$8,9 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^3 s^{-1}$
$b_L(A)-b_L(B)$	13,9	0,73	6,652	$3,3 \cdot 10^4 - 3,6 \cdot 10^3 s^{-1}$
$b_L(A)-b_H(B)$	26,0	0,76	-0,162	$3,7 \cdot 10^{-2} - 4,7 \cdot 10^{-3} s^{-1}$
$FeS(b)-c_1$	26,9	0,48	-6,105	$3,7 \cdot 10^{-9} - 4,3 \cdot 10^{-10} s^{-1}$

Der Vergleich der Raten für den Elektronen-Transfer im Cytochrom- bc_1 -Komplex (siehe Tab.15) zeigt, daß die Reduktion des Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle durch das Häm b_H der schnellste Prozeß ist, gefolgt von der Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums in b-Position durch das Ubichinol. Der Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Zentrum in

der sog. "b-Position" direkt zum Häm c_1 ist extrem langsam und unwahrscheinlich, ebenso der Elektronentransfer von einem Häm b_L des einen Monomers zum Häm b_H des anderen Monomers. Der Elektronentransfer innerhalb eines Cytochrom b Moleküls ist aufgrund der schnelleren Raten günstiger gegenüber dem Elektronentransfer zwischen den beiden Cytochrom b Molekülen in einem Enzymdimer.

3.3 Erzeugung und Untersuchung des Ubisemichinons an der Q_i -Bindungsstelle

Der Theorie des Q-Zyklus folgend tritt nach Ablauf der ersten Zyklushälfte an der Ubichinon-Reduktionsstelle (Q_i -Bindungsstelle) ein Ubisemichinonradikal als Reaktionsintermediat auf. Dieses Semichinonradikal wurde in Cytochrom- bc_1 -Komplexen aus *S. cerevisiae* (Siedow *et al.*, 1978, T'sai & Palmer, 1983), *Bos taurus* (deVries *et al.*, 1980; Ohnishi & Trumpower, 1980) und *Rhodobacter capsulatus* (Meinhardt & Ohnishi, 1992) mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) nachgewiesen und charakterisiert. In der Kristallstruktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* wird das Ubichinon an der Q_i -Bindungsstelle direkt durch Asp229 und indirekt durch His202 über Wasser Wat36 koordiniert (Hunte *et al.*, 2000; Hunte, 2001). Im Gegensatz dazu wurde die direkte Ligandierung des Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle durch His202 postuliert (Berry *et al.*, 1999; Fisher & Rich, 2000). Der dem His202 in Bakterien analoge Aminosäurerest His217 wurde mittels gezielter Mutagenese als wichtig für die Stabilisierung des Ubisemichinons identifiziert (Gray *et al.*, 1994). Das Ubisemichinonradikal im Cytochrom- bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* sollte mittels EPR-Spektroskopie hinsichtlich seiner molekularen Umgebung in der Q_i -Bindungsstelle untersucht werden. Dabei sollten besonders moderne Methoden der gepulsten EPR-Spektroskopie zur Anwendung kommen, mit denen die eingehende Untersuchung des Ubisemichinons $Q_H^{\cdot-}$ in der bo_3 Ubichinoloxidase aus *Escherichia coli* gelungen ist (Grimaldi *et al.*, 2001).

Durch partielle Reduktion des Cytochrom b des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit Natriumdithionit konnte ein proteingebundenes Ubisemichinon erzeugt werden. Die EPR-Spektroskopie an dem Ubisemichinon wurden im Rahmen einer Kooperation von

Stephane Grimaldi und Dr. Fraser McMillan von der Universität Frankfurt untersucht. Abbildung 23 zeigt das EPR-Spektrum des Ubisemichinons im Cytochrom- bc_1 -Komplex im continuous-wave-Modus (*cw-mode*).

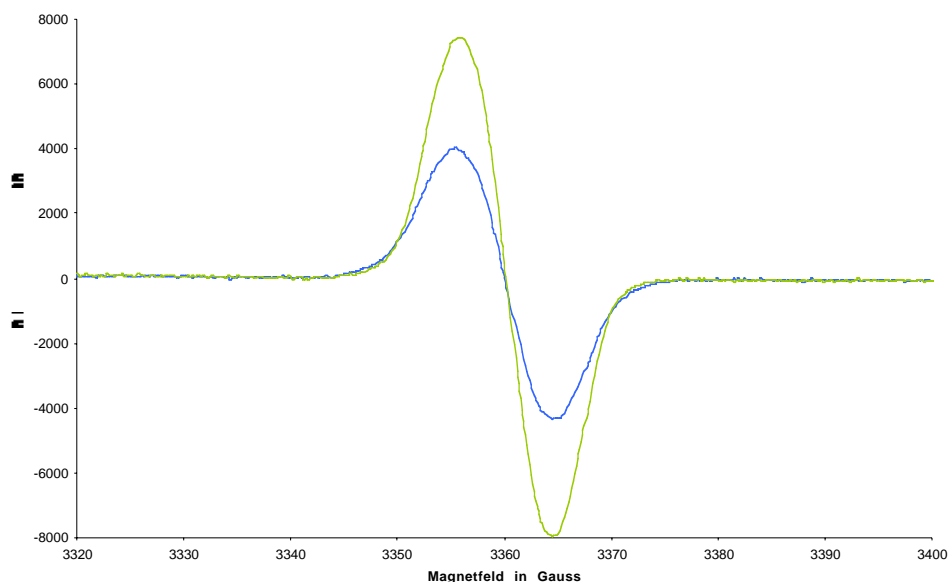


Abb. 23: cw-EPR Spektrum des Ubisemichinons im Cytochrom- bc_1 -Komplex. Signale der Probe in H_2O sind in blau, Signale der Probe in D_2O in grün dargestellt.

Durch Quantifizierung mit einem Radikalstandard konnte ermittelt werden, daß die Enzymprobe 20-25 mol% Semichinonradikal enthält. Die Linienbreite des Semichinonradikals beträgt in Wasser (H_2O) 9,3 Gauss. Zur Untersuchung von austauschbaren Protonen in der Koordinationssphäre des Radikals wurde die Enzymprobe in Deuteriumoxid (D_2O) überführt und in der deuterierten Lösung wurde ebenfalls durch partielle Reduktion das Semichinon erzeugt (siehe Abb.23). Die Linienbreite des Signals ist mit 8,8 Gauss etwas kleiner als die des Radikals in protonischer Lösung. Dies deutet auf eine Änderung der Koordinationssphäre des Semichinons durch Austausch mit dem Solvens hin.

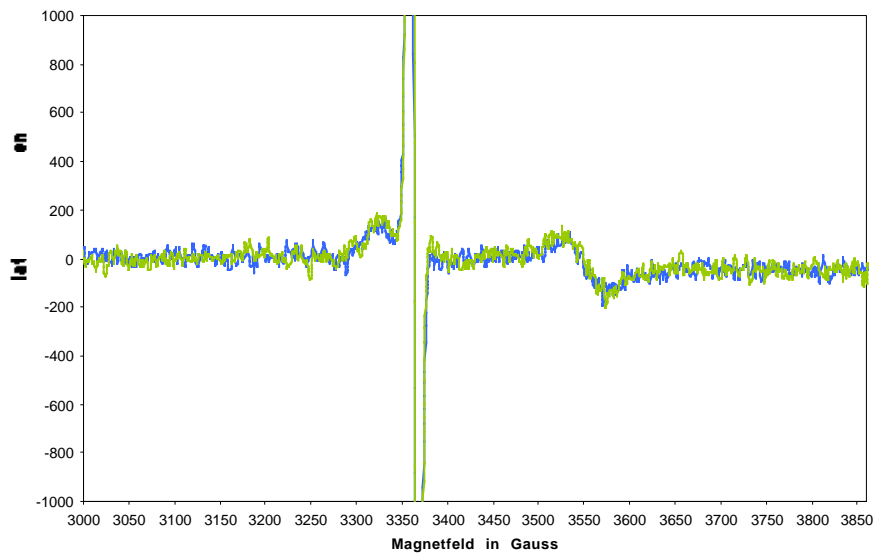


Abb. 24: cw-EPR Spektrum des Ubisemichinons im Cytochrom- bc_1 -Komplex im Bereich von 3000-3600 Gauss. Signale der Probe in H_2O sind in blau, Signale der Probe in D_2O in grün dargestellt.

Dargestellt sind zwei Spektren im Bereich von 3320 bis 3400 Gauss für die Probe in H_2O (blau) und für die Probe in D_2O (rot). Das Signal für das Semichinon liegt bei 3360 Gauss. Im Bereich von 3000 bis 3850 Gauss erkennt man das EPR Signal für das Eisen-Schwefel-Zentrum im Rieske-Protein (siehe Abb.24).

Weiterhin wurden ENDOR-Experimente an dem Semichinonradikal in protonischer und deuterionischer Lösung vorgenommen. Vergleichbare Experimente, jedoch mit cw-ENDOR, sind an dem Ubisemichinon in Succinat-Cytochrom-c-Reduktase aus *Bos taurus* vorgenommen worden (Salerno et al., 1990). Abbildung 25 zeigt das ENDOR-Spektrum im Bereich der Protonen-ENDOR-Frequenz.

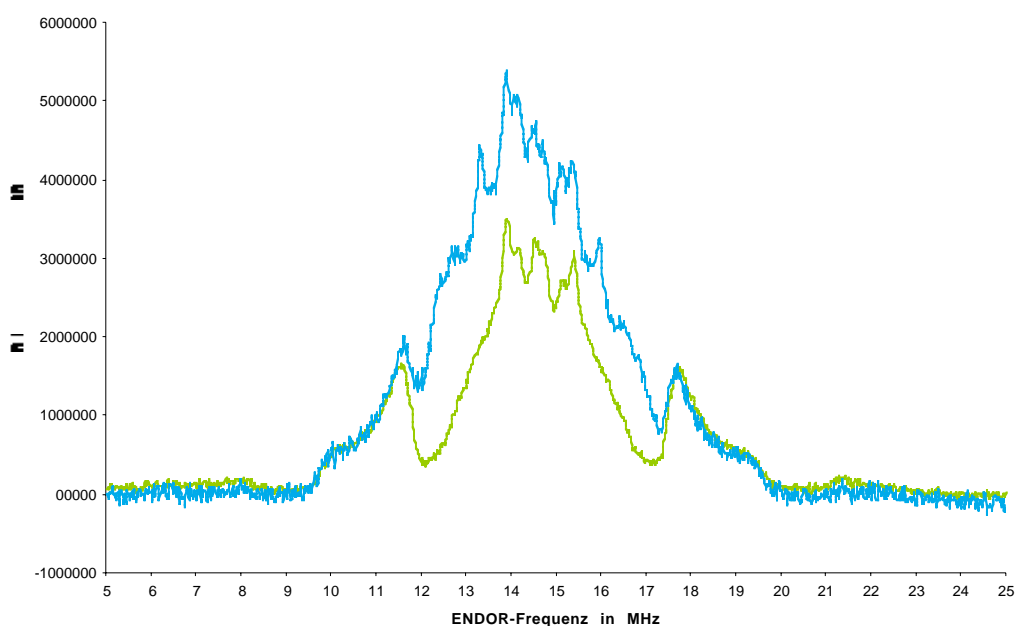


Abb. 25: ENDOR-Spektrum des Ubisemichinon-Radikals im Cytochrom- bc_1 -Komplex. Das Signal der Probe in Wasser ist in blau dargestellt, das Signal der Probe in schwerem Wasser ist in grün dargestellt.

Die Probe in deuterischer Lösung (grün) zeigt weniger Protonen-Signale als die Probe in protonischer Lösung. Das Fehlen von Signalen durch Austausch von Wasser durch schweres Wasser kann durch einen Austausch von Protonen, die das Ubisemichinon koordinieren durch Deuteronen aus dem Solvens gedeutet werden. Da die genaue Auswertung dieser ENDOR-Spektren noch nicht abgeschlossen ist, wurden die Hyperfein-Kopplungskonstanten für die Protonen noch nicht bestimmt. Mittels gepulster EPR-Spektroskopie (ESEEM-Methode) (Grimaldi et al., 2001) an der Probe soll festgestellt werden, ob das Ubisemichinon unmittelbar an einen Stickstoffliganden gebunden ist. Da die Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes keine solche Koordination des Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle zeigt, sollten die ESEEM-Experimente keine solche Koordination des Radikals zeigen. Insgesamt sollten die Ergebnisse aus den EPR-Experimenten das Bild über die Bindung des Ubichinons an der Q_i -Bindungsstelle des Cytochrom- bc_1 -Komplexes erweitern.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Phospholipide im Cytochrom-*bc*₁-Komplex

Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex ist ein integraler Membranprotein-Komplex. Die Reinigung dieses Enzymkomplexes ist mit dessen Lösung aus der inneren Mitochondrienmembran durch ein Detergens verbunden. Die weitere Reinigung mit dem Ziel der Kristallisation des Membranprotein-Komplexes beinhaltet chromatographische Schritte, in denen das Protein mit detergenshaltigem Puffer gewaschen wird. Spektroskopische Untersuchungen an Phospholipiden in Proben des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Bos taurus* (Hayer-Hartl *et al.*, 1992) haben gezeigt, daß es zwei Typen von Phospholipiden in diesem solubilisierten und gereinigten Membranprotein gibt. Phospholipide vom Typ I sind demnach in der Detergensemizelle gelöst und stehen im Austausch mit anderen Detergensemizellen. Die Phospholipide vom Typ II sind fest an das Membranprotein gebunden und stehen nicht im Austausch mit Phospholipiden vom Typ I. Dieser Einteilung folgend werden während der Proteinreinigung Phospholipide vom Typ I durch den Einsatz von Detergens in den chromatographischen Schritten entfernt. Phospholipide vom Typ II werden jedoch nicht durch das Detergens aus ihren Bindungsstellen gelöst. Die Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, daß nach der ersten Proteinreinigungsstufe (DEAE-FF-Sepharose) die Zusammensetzung der Lipide aus der Enzymprobe gegenüber der Zusammensetzung der Membran geändert war. Durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie von Lipidextrakten aus den Reinigungsstufen und aus kristallinem Protein konnte in dem gereinigten Protein nur Cardiolipin identifiziert werden. Darüber hinaus ist in allen Proteinproben Ubichinon feststellbar und zusätzliche Substanzen, die ähnliche Laufeigenschaften wie der Membranbestandteil Ergosterol aufweisen.

Mit der Massenspektrometrie konnten die Lipidextrakte detaillierter analysiert werden. Außer den identifizierten Phospholipiden wurden auch die Detergentien sowie Häm und Stigmatellin detektiert. Die Identifizierung von Sterolen wie Ergosterol war jedoch nicht möglich. Die Fettsäurezusammensetzung der mit der ESI-Massenspektrometrie

identifizierten Phospholipide mit gesättigten und einfach ungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren ist typisch für Lipide aus der inneren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae* (Daum, 1985; Schneider *et al.*, 1999). Die identifizierten Spezies für Cardiolipin sind identisch mit den Cardiolipin-Spezies, die mit Hilfe von chromatographischen Methoden in Mitochondrienmembranen von *S. cerevisiae* analysiert wurden (Schlame *et al.*, 1993). In den Proben aus der Proteinreinigung konnten PC und PI besonders deutlich analysiert werden. Die Analyse von PE in den Proben wird durch die Anwesenheit von Cardiolipin erschwert, da es zur Bildung von Ionen gleicher Masse (isobare Ionen) kommt. Die Signale bei $m/z=686$ und $m/z=714$ kommen daher durch Überlagerung von Signalen zustande. Die Analyse der Lipide aus den Membranprotein-Kristallen war problematisch, da wegen der Anwesenheit von Polyethylenglykol nur im Anionen-Modus gemessen werden konnte. In diesem Modus bilden sich jedoch nur bei Anwesenheit hoher Chlorid-Konzentrationen PC-Anionen. Daher ist die Analyse dieses Phospholipids aus Kristallen des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes nicht einfach zumal bei der Analyse ein zeitliches Schwanken dieser PC-Anionen-Signale gesehen wurde. Zur quantitativen Analyse der Phospholipide aus dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex sollte die Lipidextraktion möglichst umgangen werden, da sich gezeigt hat, daß die Anwesenheit großer Mengen an Detergens die quantitative Analyse behindert (Hanekop, 2001). Eine direkte chromatographische Methode könnte diese quantitative Analyse ermöglichen.

4.2 Gebundene Phospholipide in der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae*

Die in der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes identifizierten Phospholipide stammen aus der Grenzfläche zwischen dem Membranprotein und der fluiden Phospholipidmembran. Solche Grenzflächenlipide (engl. *boundary lipids*) sind aus den Strukturen anderer Membranproteine bekannt (Fyfe *et al.*, 2001). Die Relevanz solcher Lipide für die Struktur und Funktion eines Membranproteins ist vor dem Hintergrund ihrer Mobilität diskutiert worden (Pebay-Peyroula & Rosenbusch, 2001). Die Identifizierung der Kopfgruppen der gebundenen Lipide läßt jedoch auf eine spezifische

Bindung der Lipide schließen, die deren Mobilität verringert. Es wird angenommen, daß die in der Struktur identifizierten Phospholipide zum Typ II gehören, die nicht mit gelösten Phospholipiden in der Detergensemizelle im Austausch stehen. Die spezifische, feste Bindung der Lipide läßt den Schluß zu, daß diese von Bedeutung für die strukturelle oder funktionelle Integrität des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes sind.

Die gebundenen Phospholipide und das Detergens befinden sich an Interaktionsflächen von einzelnen Untereinheiten des Enzymkomplexes. Es ist davon auszugehen, daß das gebundene Detergensmolekül zur Stabilisierung der Interaktion zwischen dem Core-Protein 1 und der Untereinheit 9 beitragen kann, da deren Interaktionsfläche sehr klein ist. Jedoch sind die ligandierenden Aminosäurereste des Core-Proteins 1 und der Untereinheit 9 nicht konserviert (siehe Anhang). Konsistent damit ist auch, daß in der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Bos taurus* (Iwata *et al.*, 1998) an dieser Stelle kein Detergensmolekül identifiziert werden konnte. Die Bindung des maltosidischen Detergens-Moleküls an dieser Stelle ist daher als spezifisches Phänomen für *S. cerevisiae* zu sehen. Die Phosphodiester-Gruppe des Lipid L1 wird durch His222 des Cytochrom *b* ligandiert. Durch die Nähe dieses Liganden zu Met221 ist eine Stabilisierung der Q_i-Bindungsstelle durch dieses Lipid möglich. Das Lipid L2 zwischen den Monomeren ist vermutlich nicht essentiell für die Dimerisierung des Enzymkomplexes. Die Stabilisierung des Dimers wird wahrscheinlich durch Interaktion der beiden Cytochrom-*b*-Monomere und die beiden Core-Proteine 2, sowie durch die Interaktion des Rieske-Proteins in der b-Position mit dem Cytochrom *b* erreicht wird. Das Lipid L2 schließt mit seinen Fettsäureketten eine V-förmige Öffnung an der Interaktionsfläche der beiden Cytochrom-*b*-Monomere. Der Austausch von Ubichinon und Ubichinol zwischen der Q_o-Bindungsstelle und der Q_i-Bindungsstelle ist aufgrund der Helixpackung des Cytochrom *b* nur zwischen den beiden monomeren möglich (Hunte *et al.*, 2000). Die Position des Lipids L2 könnte daher für eine Diffusion von Substratmolekülen zwischen den Monomeren wichtig sein.

4.2.1 Das "interhelikale" Phosphatidylinosit

Das "interhelikale" Phospholipid befindet sich an einer Stelle des Enzyms, an der die drei katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b*, Cytochrom *c*₁ und das Rieske-Protein eine Interaktionsstelle bilden. Die Position dieses Lipids zwischen den Transmembranhelices der katalytischen Untereinheiten im hydrophoben Bereich der Membran nahe der Intermembranseite, sowie dessen gebogene Konformation in der gedachten Membranebene unterscheiden dieses Lipid von den anderen in der Struktur identifizierten Lipiden. Die Inositolkopfgruppe erlaubt ein ausgeprägtes Netzwerk von Wasserstoffbrücken zu den benachbarten Aminosäureresten. Sowohl die Kopfgruppe als auch die Fettsäureketten interagieren mit allen drei katalytischen Untereinheiten.

Die Kopfgruppe dieses Lipids interagiert unter anderem mit Ser80 des Rieske-Proteins. Dieser Aminosäurerest bildet das Ende der Transmembranhelix und liegt somit an der Grenze zur flexiblen Linker-Region (Nett *et al.*, 2000). Diese Linke-Region verbindet die Transmembranhelix mit der C-terminalen Domäne des Rieske-Proteins, die das Eisen-Schwefel-Zentrum enthält. Diese Domäne führt während des Elektronen-Transfers von der Q_o-Bindungsstelle zum Cytochrom *c*₁ eine Drehbewegung aus (Izrailev *et al.*, 1999; Nett *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Eine mögliche Funktion des interhelikalen Lipids könnte eine Ableitung von Torsionskräften von der Transmembranhelix des Rieske-Proteins zu dem umgebenen Protein sein. Möglich ist auch, daß das interhelikale PI eine Rolle bei der Assemblierung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes spielt oder für dessen strukturelle Integrität wichtig ist. Die Mutation des Lys272 des Cytochrom *c*₁ zu Ala272 (Lange *et al.*, eingereicht) liefert einen in der Membran voll assemblierten Cytochrom-*bc*₁-Komplex, von dem jedoch bei dessen Reinigung das Rieske-Eisen-Schwefel Protein abdissoziiert. Da das Lys272 eine ionische Wechselwirkung zu der Phosphodiestergruppe des PI-Moleküls macht, geht durch die genannte Mutation diese Wechselwirkung verloren. Der Verlust des Rieske-Proteins bei der Proteinreinigung kann als Hinweis auf den Verlust des PI-Moleküls gesehen werden. In der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Gallus gallus* (Zhang *et al.*, 1998) wurde an der gleichen Stelle ein Detergens-Molekül (Octyl-glucosid) identifiziert.

4.2.2 Die Bindungsstelle für Cardiolipin

Das in der Struktur identifizierte Cardiolipin-Molekül (Lipid L5) ist in einer Tasche an der Außenseite des Enzymmonomers neben Lipidmolekül L4 gebunden. Das Lipid L4 zeigt ein auffällig abgeknickte Fettsäurekette, die in einer sehr hydrophoben Höhlung des Cytochrom *b* steckt. In der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Gallus gallus* ist an dieser Stelle ebenfalls ein PE-Molekül gebunden, dessen eine Fettsäurekette den gleichen Knick aufweist und ebenfalls in eine hydrophobe Höhlung des Cytochrom *b* zeigt. Diese hydrophobe Höhlung gehört demnach zu der konservierten Bindungstasche für dieses Phospholipid und dient vermutlich der Verankerung des Lipids. Das Trp29 des Cytochrom *b* separiert in der Glycerin-Region das Lipid L4 von dem Cardiolipin-Molekül. Eine vergleichbare Position eines Tryptophanrestes ist in der Struktur des Bakteriorhodopsins beobachtet worden und ist dort wichtig für die Interaktionen dieses Membranproteins mit Lipiden der Purpurmembran (Essen *et al.*, 1998). Solche oberflächenexponierten Tryptophanreste sind typisch für Membranproteine (Deisenhofer & Michel, 1989; Yau *et al.*, 1998).

Die Phosphodiestergruppe A des Cardiolipin-Moleküls wird von hochkonservierten Lysinresten (Lys288, Lys289) des Cytochrom *c*₁ ligandiert. Zusätzlich befinden sich die vollkonservierten Lysinreste Lys296 des Cytochrom *c*₁ und Lys228 des Cytochrom *b* in der Nähe der Phosphodiestergruppen A und B. Die Bindungsstelle des CL-Moleküls kann daher als konserviert betrachtet werden. Dies unterstützen Experimente zur Entfernung von Cardiolipin aus dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Bos taurus* durch Lipidverdau mit Phospholipasen (Gomez & Robinson, 1999). Diese haben gezeigt, daß der delipidierte Enzymkomplex strukturell destabilisiert ist und die Untereinheiten IV, V, VII vom Komplex dissoziieren. Da diese Untereinheiten alle auf der von der Intermonomerfläche abgewandten Seite liegen, wurde dort eine Bindungsstelle für Cardiolipin postuliert. Die in der Kristallstruktur identifizierte Bindungsstelle liegt in dieser Region des Enzyms. Die Untersuchung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus der Cardiolipin-defizienten *crd1*-Mutante haben jedoch deutlich gezeigt, daß das Fehlen von Cardiolipin in der Membran nicht das Assemblieren eines kompletten Cytochrom-*bc*₁-Komplexes stört. Die gegenüber

dem Enzym aus der Wildtyp-Membran deutlich verringerte enzymatische Aktivität läßt aber auf eine funktionelle Wichtigkeit des Cardiolipins für die Funktion des Enzyms schließen. Untersuchungen am Enzym aus *Bos taurus* haben gezeigt, daß der Verlust von Cardiolipin mit einem Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht (Gomez & Robinson, 1999; Schägger *et al.*, 1990). Zur Beantwortung der Frage, wie das gebundene Cardiolipin-Molekül zur enzymatischen Aktivität beiträgt wird es daher wichtig sein, den Cytochrom- bc_1 -Komplex aus der *crd1*-Mutante strukturell zu untersuchen. Durch Vergleich mit dem gebundenen Cardiolipin-Molekül im photosynthetischen Reaktionszentrum (McAuley *et al.*, 1999) stellt man fest, daß in beiden Fällen die zentrale Hydroxy-Gruppe des Cardiolipins in unmittelbarer Nähe zu einem Histidinrest liegt. Die mögliche zweite Bindungsstelle für Cardiolipin im Cytochrom- bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* an der Schnittstelle von Core-Protein 1 und dem N-Terminus des Cytochrom *b* besitzt ebenfalls einen Histidinrest, der über der zentralen Hydroxygruppe des Lipids positioniert wäre. Daher kann man vermuten, daß eine solche Umgebung mit einem Histidinrest Teil eines konservierten Bindungsmotivs für Cardiolipin in Membranproteinen sein könnte.

4.2.3 Mögliche Funktion des gebundenen Cardiolipins bei der Protonierung während der Ubichinonreduktion

In der Struktur des Enzyms wurden zwei mögliche Protonierungspfade für die Protonierung des gebundenen Ubichinons ermittelt (Lange *et al.*, eingereicht). Der sog. E/R-Pfad verläuft von Glu52 der Untereinheit 7 über Arg218 von Cytochrom *b* entlang einer Kette von Wassermolekülen zu His202 des Cytochrom *b*. His202 ligandiert über Wasser36 einen Carbonylsauerstoff des Ubichinons (Hunte *et al.*, 2000). Arg218 ist hochkonserviert in Cytochrom *b* (Degli Esposti *et al.*, 1993).

Der sog. CL/K-Pfad verläuft von der Phosphodiestergruppe B des Cardiolipins (Lipid L5) über Wasser141 zu Lys228 des Cytochrom *b* und von dort über Wassermoleküle zu Asp229 des Cytochrom *b*, das einen Carbonylsauerstoff des Ubichinons ligandiert. Das gebundene Cardiolipin könnte einerseits die Proteinumgebung des CL/K-Pfades stabilisieren oder es könnte direkt an der Protonenaufnahme beteiligt sein. Cardiolipin

zeigt in wäßriger Lösung als einziges Phospholipid einen pK_a -Wert nahe des physiologischen pH-Werts (Kates *et al.*, 1993), der durch spezielle Wasserstoffbrücken innerhalb des Moleküls erklärt wird (Hübner *et al.*, 1991). Das gebundene Cardiolipin könnte daher als Puffer am Eingang zum CL/K-Pfad dienen. Das direkt benachbarte Lipid L4, ein Phosphatidylethanolamin, hat wie die Phosphodiestergruppe B des Cardiolipins keinen Liganden mit einer kompensierenden positiven Ladung. Durch die Verankerung einer Fettsäurekette in einer hydrophoben Höhlung des Cytochrom *b* wird dieses Lipid in der Nähe des Cardiolipins gehalten. Das zwischen den beiden Phospholipiden gebundene Wasser⁴¹⁵ kann man deshalb als gut protonierbar betrachten und könnte den Eingang zum CL/K-Pfad bilden. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, daß das Cardiolipin die Verbindung zwischen der Matrixseite der Membran und dem CL/K-Pfad bildet. Dadurch könnte die Protonierung bei der Reduktion des Ubichinons direkt an das Membranpotential gekoppelt sein.

Bemerkenswert ist, daß der CL/K-Pfad in der gedachten Membranebene verläuft, während der E/R-Pfad einen Weg von etwa 10 Å entlang der Membrannormalen beinhaltet. Demnach sind beide Protonierungspfade für die Q_i -Bindungsstelle durch das Membranpotential unterschiedlich beeinflussbar. Dieser Unterschied der beiden Protonierungspfade deutet darauf hin, daß diese für die Protonierung der beiden Reduktionsprodukte Semichinonanion und Chinolanion spezialisiert sind. Die pK_a -Werte dieser beiden Chinon-Spezies liegen bei 6.5 (Land & Swallow, 1970) und 10.5 (Rich, 1984). Durch elektrometrische Messungen am Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Rhodobacter sphaeroides* (Drachev *et al.*, 1989, Mulkidjanian *et al.*, 1990) konnte gezeigt werden, daß die Protonierung des Ubichinolanions in der Q_i -Bindungsstelle elektrogen ist. Der CL/K-Pfad verläuft nahezu parallel zur Membranebene. Aufgrund des Verlaufs des E/R-Protonierungspfades nahezu parallel zur Membrannormalen kann man annehmen, daß der E/R-Pfad wahrscheinlich für den elektrogenen Schritt der Protonierung des Chinol-Anions benutzt wird, während das Semichinon-Anion wahrscheinlich über den CL/K-Pfad protoniert wird. Die Rolle des gebundenen Cardiolipin-Moleküls könnte demnach darin bestehen, das Ubisemichinon-Radikal zu protonieren.

4.3 Funktionelle Implikationen aus der Struktur des Komplexes mit gebundenem Cytochrom *c*

Obwohl die Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Bos taurus* mit seinem Substrat Cytochrom *c* in der Literatur beschrieben wurde (Yu et al., 1996), konnte die Struktur des Enzym-Substrat-Redoxkomplexes bis jetzt nicht bestimmt werden. Ausgehend von der Struktur des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Gallus gallus* wurde die Struktur eines hypothetischen Komplexes präsentiert (Zhang et al., 1998).

Die hier beschriebene Struktur des Komplexes bestehend aus Cytochrom-*bc*₁-Komplex und Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* erlaubt erstmals einen detaillierten Einblick in den Bindungsmodus des Cytochrom *c* im Komplex mit einem Membranproteinkomplex aus dem Energiestoffwechsel. Die Struktur läßt vielfältige Rückschlüsse über die intermolekularen Kräfte während der Cytochrom-*c*-Bindung, über die Kinetik der Cytochrom-*c*-Reduktion und über die mögliche Koordination der Reduktionsstellen für Cytochrom *c* und Ubichinon.

4.3.1 Die Eigenschaften der Cytochrom-*c* -Bindungsstelle

Die Bindungsstelle für das Cytochrom *c* am Cytochrom *c*₁ besteht aus einer komplementären trapezförmigen Interaktionsfläche. Die Größe der Interaktionsfläche von 880 Å² ist im Vergleich zu anderen Proteinkomplexen sehr klein (Lo Conte, 1999). Die kleine Interaktionsfläche läßt den Schluß zu, das der Redoxkomplex nicht sehr stabil ist und beide Cytochrome ohne starke Konformationsänderungen miteinander interagieren. Die in der Interaktionsfläche liegenden Aminosäurereste besitzen einen stark hydrophoben Charakter. In der Struktur des Komplexes aus Cytochrom *c* und Cytochrom-*c*-Peroxidase sind in der Interaktionsfläche ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen vorherrschend (Pelletier & Kraut, 1992).

Aminosäureseitenketten mit komplementärer Ladung umschließen die hydrophobe Interaktionsfläche. Die Architektur des Redoxkomplexes steht im Einklang mit einem Zwei-Domänen-Modell (Ubbink *et al.*, 1999; Tetreault *et al.*, 2001). Die Bindung des Redoxpartners geschieht demnach durch eine hydrophobe Domäne, die den direkten

Kontakt der beiden Redoxpartner ermöglicht und durch eine geladene Domäne, die die beiden Redoxpartner in die richtige, produktive Orientierung bringt. Durch die relativ große Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen wirkten sich die elektrostatischen Kräfte besonders auf den Assoziationsvorgang und den Dissoziationsvorgang aus. Die kurzreichweitigen hydrophoben Kräfte dienen der genauen Orientierung der Redoxzentren für den Elektronentransfer. Die elektrostatischen Wechselwirkungen können, aufgrund der Entfernung der geladenen Reste voneinander, durch Wasser vermittelt werden. In der Kristallstruktur des Komplexes kann aufgrund der Auflösung von 3 Å keine Positionsbestimmung von Wassermolekülen vorgenommen werden. Jedoch zeigt die Überlagerung der Hochauflösungsstruktur des Cytochrom *c* mit der Struktur des komplexierten Cytochrom *c*, daß ein Teil der im Cytochrom *c* identifizierten Wassermoleküle an der Peripherie der Interaktionsfläche liegen könnten.

Aus Aminosäuresequenzvergleichen der beiden Cytochrome geht hervor, daß die miteinander interagierenden Aminosäurereste in mitochondrialen Cytochrom-*bc*₁-Komplexen nicht stark konserviert sind. Dies läßt den möglichen Schluß zu, daß die Bindung des Cytochrom *c* spezifisch für *S. cerevisiae* ist. Die Elektronendichte für Cytochrom *c* aus Pferd zeigt keine eindeutigen Details, so daß das Cytochrom *c* nicht positioniert werden kann. Versuche einer Verfeinerung mit dem "rigid-body"-Verfahren waren erfolglos. Die fragmentarische Elektronendichte zeigt jedoch nicht an der erwarteten Eisen-Position ein Maximum. Dies könnte als Evidenz für eine speziesspezifische Bindung des Cytochrom *c* an den Cytochrom-*bc*₁-Komplex angesehen werden.

4.3.2 Die Kinetik der Cytochrom-*c* -Reduktion

Aus der Struktur des Redoxkomplexes kann auf die Kinetik der Reduktion des Cytochrom *c* geschlossen werden. Mit Hilfe des Modells für den Elektronen-Transfer in Proteinen von Dutton (Moser *et al.*, 1999) ergibt sich eine maximale Transferrate von $8,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Experimentell wurde mit einem Rutheniumderivat des Cytochrom *c* aus Pferdeherz und dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus Rinderherz eine Rate von $1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$

bestimmt (Tian *et al.*, 2000). Die Diskrepanz von mehr als zwei Größenordnungen ergibt sich wahrscheinlich aus der physiologisch unrelevanten Bindung des Cytochrom *c*-Ruthenium-Derivates an das Enzym. Die verwendete Rutheniummarkierung ist kovalent an Lys 72 gebunden. Dieser Aminosäurerest befindet sich in der Kristallstruktur am Rand der Interaktionsfläche. Der Durchmesser des Rutheniumderivates wird mit 18 Å angegeben (Heacock *et al.*, 1993). Vermutlich ist die physiologisch wichtige Interaktion der beiden Cytochrome dadurch gestört und resultiert in einem längeren Abstand der beiden Häm-Gruppen und somit in einer langsameren Reduktion des Cytochrom *c*.

Der Vergleich der optimierten Elektron-Transfer-Raten im Cytochrom-*bc*₁-Komplex zeigt, daß die Reduktion des Cytochrom *c* der drittschnellste Schritt der Elektronen-Transfer-Prozesse ist. Aus diesem Vergleich läßt sich auch folgern, daß die Reduktion des Cytochrom *c* nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Dies steht im Einklang mit dem Ergebnis, daß der langsamste Schritt im Cytochrom-*bc*₁-Komplex die Deprotonierung des Ubichinols an der Qo-Bindungsstelle ist (Brandt & Okun, 1997). Die Untersuchung der Wechselzahl des Enzyms bei unterschiedlichen Ionenstärken hat gezeigt, daß die Enzymaktivität von der Ionenstärke abhängt und ein Optimum bei einer mittleren Ionenstärke von 100-150 mM besitzt. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe für Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* und *Equus caballus* legen den Schluß nahe, daß der Ionenstärke-Effekt auf die Enzymaktivität mit der Bindung und Reduktion des Cytochrom *c* zu tun hat. Kinetische Experimente mit Mutanten des Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* (Komar-Panicucci *et al.*, 1996) haben gezeigt, daß die Reduktion des Cytochrom *c* durch den Cytochrom-*bc*₁-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Enzym ist. Die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen mit dem Effekt der Hemmung der Enzymaktivität durch hohe Cytochrom-*c*-Konzentrationen in den Aktivitäts-Assays erklärt werden (Speck & Margoliash, 1984).

4.3.3 Die Kontrolle der Cytochrom-*c* -Reduktion

Cytochrom *c*₁ und Cytochrom *c* gehören beide zur Klasse I der Cytochrome vom *c*-Typ. Der extramembrane Teil des Cytochrom *c*₁ besteht aus Helices $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 1''$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ (Hunte *et al.*, 2000). Die Sekundärstrukturen beider Cytochrome sind sehr ähnlich.

Die Redoxpotentiale der beiden Cytochrome wird in der Literatur mit etwa 270 mV angegeben (T'sai & Palmer, 1983; Cutler *et al.*, 1987). Die Triebkraft des Elektronentransfers ist daher nahe null. Die Reduktion des Cytochrom *c* sowie die entsprechend rückwärtige Reduktion des Cytochrom *c*₁ laufen daher mit gleichen Aktivierungsenergien ab. Zur Vermeidung der Rereduktion des Cytochrom *c*₁ muß daher der Redoxkomplex sehr labil sein und schnell dissoziieren können. Außerdem muß das Cytochrom *c*₁ schnell durch das Rieske-Zentrum reduziert werden. Als Möglichkeit zur Vermeidung der Rückreaktion wurde eine Konformationsänderung des Cytochrom *c* bei der Bindung an seine Redoxpartner postuliert (Döpner *et al.*, 1999). Durch die Konformationsänderung soll das Redoxpotential des Cytochrom *c* verringert werden und die daraus resultierende positive Triebkraft die Rückreaktion unmöglich machen.

4.3.4 Konformationsunterschiede durch Komplexbildung

Untersuchungen am Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* haben gezeigt, daß das Protein bei der Interaktion mit negativ geladenen Oberflächen großen Konformationsumwandlungen unterworfen wird, die mit einer Dissoziation des Axialliganden Met80 vom Häm-Eisen und einer Änderung des Redoxpotentials einhergehen (Döpner *et al.*, 1999). Diese Konformationsumwandlung ist als Möglichkeit der Kontrolle des Elektronentransfers zwischen Cytochrom *c* und seinen physiologischen Redoxpartnern vorgeschlagen worden.

In der Struktur des Komplexes wurden weder für Cytochrom *c* noch für den Cytochrom-*bc*₁-Komplex signifikante Konformationsänderungen gefunden. In der Struktur des Cytochrom *c* weist lediglich die Polypeptidkette im Bereich der Reste Gly 23 Gly 24 Pro 25 eine andere Position im Vergleich zur Struktur des unkomplexierten Cytochrom *c* auf. Dies könnte damit erklärt werden, daß das Cytochrom *c* bei sehr hoher Ionenstärke kristallisiert wurde, während die Kokristallisation bei relativ moderater Ionenstärke durchgeführt wurde. Die durch NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur des oxidierten Cytochroms *c* aus *S. cerevisiae* (Banci *et al.*, 1997) zeigt, daß die Aminosäurereste 14-26 eine relativ große Mobilität besitzen. Diese Struktur wurde in einem 50 mM Phosphatpuffer gemessen. Pro76 zeigte gegenüber der Hochauflösungsstruktur ebenfalls

eine leicht andere Konformation. NMR-Spektroskopie am Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* hat gezeigt, daß das Protein besonders in der oxidierten Form im Bereich von Pro76 flexibel ist (Barker *et al.*, 2001).

4.3.5 Die Rolle des "Hinge"-Proteins bei der Bindung des Cytochrom *c*

Die Untereinheit 6 des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae* besitzt einen sehr aziden N-terminalen Bereich. Dieser Bereich von 47 Aminosäuren ist in der 2,3 Å Struktur nicht definiert und ist deshalb möglicherweise mobil (Hunte *et al.*, 2000). Die analoge Untereinheit (Loon van *et al.*, 1984) im Enzym aus Rinderherz wurde aufgrund von chemischen Markierungsexperimenten (Gutweniger *et al.*, 1983; Stonehuerner *et al.*, 1985) als wichtig für die Bindung des Cytochrom *c* identifiziert. Die Untereinheit 6 ist in *S. cerevisiae* nicht essentiell für die enzymatische Aktivität des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes, jedoch führt die Deletion der Untereinheit zu einer starken Abnahme der enzymatischen Aktivität (Schoppink *et al.*, 1988). Bei fehlender Untereinheit 6 in *S. cerevisiae* sind azide Aminosäurereste des Cytochrom *c*₁ essentiell für die Bindung des Cytochrom *c* (Nakai *et al.*, 1993).

In der Kristallstruktur des Redoxkomplexes läßt sich der N-terminale Bereich der Untereinheit 6 ebenfalls nicht strukturell identifizieren. Jedoch ist der N-Terminus des geordneten Bereichs der Untereinheit 6 in kurzem Abstand zu einem Bereich des Cytochrom *c*, der die vollkonservierten Lysinreste 78 und 79 sowie Lysinreste 4 und 5 enthält. Aufgrund fehlender Elektronendichte, die auf eine ionische Interaktion der Untereinheit 6 mit Cytochrom *c* schließen ließe, muß davon ausgegangen werden, daß diese Untereinheit nicht direkt mit Cytochrom *c* interagiert. Der Einfluß des Dipolmoments von Cytochrom *c* auf dessen Bindung an Redoxpartner ist diskutiert worden (Margoliash & Bosshard, 1983). Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* besitzt im Vergleich zu Cytochrom *c* aus Säugetieren ein relativ großes Dipolmoment von 554 Debye im Vergleich zu 283 Debye bei Pferd (Tiede *et al.*, 1993). Die positive Seite des Dipols zeigt beim Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* in die Region zwischen Thr12 und Arg13. Im Komplex mit dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex zeigt somit das Dipolmoment direkt auf den N-terminalen Bereich des "Hinge"-Proteins. Die Funktion dieser

Untereinheit könnte daher darin bestehen Cytochrom *c* zu orientieren, so daß ein produktiver Komplex mit dem Cytochrom c_1 gebildet werden kann. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hinge-Proteine aus *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Solanum tuberosum*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Anhang) zeigt, daß der azide N-terminale Bereich des Hinge Proteins bei den Hefen besonders lang ist. Zudem ist der Bereich von Glu70 bis Glu74 mit Ausnahme des Proteins aus *Solanum tuberosum* voll konserviert und enthält ausschließlich Glutamatreste. Dieser konservierte Glutamat-Bereich könnte zur Orientierung des Cytochrom *c* mittels Ionen-Dipol-Wechselwirkungen dienen. Solche attraktiven Kräfte haben eine geringere Reichweite als ionische Wechselwirkungen. Die mögliche Orientierung des Cytochrom *c* durch das "Hinge"-Protein würde daher erst bei großer Nähe zum Cytochrom c_1 wirken. Daß die aziden N-Termini der "Hinge"-Proteine bei den Hefen länger sind als bei den Säugern könnte auf eine evolutionäre Veränderung des Bindungsmodus für Cytochrom *c* hindeuten, zudem bei Säugern das Dipolmoment des Cytochrom *c* im Vergleich zum Cytochrom *c* aus Hefe kleiner ist (Tiede *et al.*, 1993).

4.3.6 Die Stöchiometrie der Cytochrom-*c*-Bindung

Der Cytochrom- bc_1 -Komplex besitzt innerhalb eines Homodimers zwei Bindungsstellen für Cytochrom *c*. In der Kristallstruktur konnte nur an einer der beiden Stellen Elektronendichte gefunden werden, die eine eindeutige Positionierung des Cytochrom *c* zuläßt. An der zweiten Bindungsstelle findet sich lediglich fragmentarische Dichte mit einem Dichtemaximum an der möglichen Position des Häm *c* Eisens. Die Bindung des Cytochrom *c* an nur einer Seite des Homodimers läßt sich nicht durch eine zu geringe Cytochrom *c* Menge im Kristallisationsansatz erklären, da mit einem leichte Cytochrom *c* Überschuß kristallisiert wurde. Ein nur zur Hälfte aktiver Cytochrom- bc_1 -Komplex wurde bei der Deletion der Untereinheit 6 gefunden (Schmitt & Trumpower, 1990). Es wurde vorgeschlagen, daß das Enzym in Abhängigkeit vom Zustand der Atmungskette mit nur einem Monomer funktionieren kann.

4.3.7 Mögliche Koordinierung der Cytochrom-*c*-Bindungsstelle mit der Q_i-Bindungsstelle

Die Elektronendichte für das an der Q_i-Bindungsstelle gebundene Ubichinon zeigt sich in der Kristallstruktur in beiden Monomeren unterschiedlich stark ausgeprägt. Das an der Cytochrom-*c*-Bindung beteiligte Monomer zeigt deutlichere Elektronendichte für den Benzochinon-Ring des Ubichinons. In der Struktur ist an der Q_o-Bindungsstelle Stigmatellin gebunden. Dieser Inhibitor stellt ein Reaktionsintermediat der Ubichinol-Oxidation dar (Lancaster & Michel, 1997; Hunte *et al.*, 2000). Die Korrelation der Besetzungsgrade der Bindungsstellen für Cytochrom *c* und Ubichinon können daher auch als koordinierte Bindung der Elektronenakzeptoren bei der Oxidation des Ubichinols interpretiert werden.

Durch Messungen der Reduktionskinetiken im Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *S. cerevisiae* (Snyder & Trumpower, 1999; Snyder *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, daß die Reduktionskinetik der Hochpotentialkette von der Besetzung der Q_i-Bindungsstelle abhängt. Bei Abwesenheit von Ubichinon oder Anwesenheit des Inhibitors Antimycin ist die Reduktion des Cytochrom *c*₁ um eine Größenordnung langsamer als im Fall von gebundenem Ubichinon. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde ein konzertierter Mechanismus der Oxidation des Ubichinols an der Q_o-Bindungsstelle postuliert. Ein analoger Zusammenhang zwischen beiden Reduktionsstellen wurde für den Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Neurospora crassa* gefunden (Linke *et al.*, 1986). Eine mögliche Ursache für die hälftige Bindung des Cytochrom *c* könnte auch der unterschiedliche Redoxzustand der beiden Niedrigpotentialketten im Homodimer sein.

4.3.8 Übertragbarkeit der Interaktion des Cytochrom *c* mit dem Cytochrom-*bc*₁-Komplex auf dessen Interaktion mit der Cytochrom-*c* - Oxidase und anderen Komplexpartnern

Untersuchungen mit chemischer Markierung von Cytochrom *c* haben gezeigt, daß sich die Interaktionsseite des Cytochrom *c* bei dessen Reduktion durch den Cytochrom-*bc*₁-

Komplex kaum von der bei dessen Oxidation durch die Cytochrom-*c*-Oxidase unterscheidet (Rieder & Bosshard 1980). Deshalb sind die in der Komplexstruktur an der Bindung beteiligten Aminosäurereste des Cytochrom *c* vermutlich auch an der Bindung zur Cytochrom-*c*-Oxidase beteiligt. Interessanterweise wurde Arg13 des Cytochrom *c* als wichtiger Rest für die Bindung an die Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Bos taurus* identifiziert (Huang *et al.*, 1994; Parrish *et al.*, 2001). Bei einer Mutation von Arg13 im Cytochrom *c* kommt es zu einer drastischen Verringerung der Enzymaktivität. In der Kristallstruktur des Komplexes aus Cytochrom *c* und Cytochrom *c* Peroxidase (Pelletier & Kraut, 1992) wurde ebenfalls Arg13 als wichtiger Aminosäurerest für die Komplexbildung identifiziert.

4.4 Eigenschaften des Ubisemichinons an der Q_i-Bindungsstelle

Nach der Theorie des Q-Zyklus tritt nach Ablauf der ersten Ubichinoloxidation ein Ubisemichinonradikal auf. Die modernen Methoden der gepulsten EPR-Spektroskopie eröffnen die Möglichkeit die molekulare Umgebung eines solchen Ubisemichinons im Cytochrom-*bc*₁-Komplex zu untersuchen. Durch partielle Reduktion des Enzyms konnte ein Semichinonradikal generiert werden. Dieses Semichinon zeigt im "continuous wave"-Modus ein EPR-Signal mit spektralen Eigenschaften, die für Ubisemichinonradikale typisch sind. Im Cytochrom-*bc*₁-Komplex aus *Bos taurus* konnte die Stabilisierung des Ubisemichinonradikals bei hohem pH-Wert (pH 8-9) gezeigt werden (Ohnishi & Trumpower, 1980). Dies deutet gemeinsam mit dem relativ niedrigen pK_a-Wert von 6,5 (Land & Swallow, 1970) darauf hin, daß das Radikal an der Q_i-Bindungsstelle ein Semichinon-Anion ist. Durch Proton/Deuteron-Austausch konnte gezeigt werden, daß dieses Semichinon in seiner unmittelbaren Umgebung austauschbare Protonen besitzt. Dies zeigte sich in der geringeren Linienbreite des cw-EPR-Signals und auch durch das Fehlen von Protonen-Signalen im ENDOR-Spektrum der Probe in schwerem Wasser. Demnach wird das Radikal von Protonen koordiniert, die mit dem Solvens austauschen. Eine Verbindung des Ubisemichinons an der Q_i-Bindungsstelle ist durch den Q-Zyklus vorgegeben und trägt zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradientens bei.

Die Auswertung der ENDOR- und der ESEEM-Spektren ist noch nicht abgeschlossen. Es wird erwartet, daß die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie an dem Ubisemichinon einen detaillierten Einblick in die molekulare Umgebung dieses Radikals zulassen, der für das Verständnis der Kopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation im Cytochrom-*bc*₁-Komplex wichtig ist.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Biologisches Material

S. cerevisiae-Stämme:

Stamm	Genotyp	Referenz
LU983	WT	Stammsammlung der BASF, Ludwigshafen
FGY-3	WT	M. Greenberg, Wayne State University, Detroit
FGY-2	crd1d	M. Greenberg, Wayne State University, Detroit

5.1.2 Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Merck KGaA Darmstadt), SIGMA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und Roth (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) in analysenreiner Qualität bezogen, falls nicht anders angegeben. Detergenzien wurden von Anatrace, Biomol und Calbiochem bezogen. Phospholipidstandards waren von Avanti Polar Lipids (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA).

Allgemeine Chemikalien

Phospholipide als Standards für die ESI-Massenspektrometrie

1,3-Bisphosphatidylglycerin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
1,2-Dioleoylphosphatidsäure	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
1,2-Dioleoylphosphatidylinosit	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
1,2-Dioleoylphosphatidylethanol-	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA

amin

1,2-Dioleoylphosphatidylcholin Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA

5.1.3 Proteine

Cytochrom *c* Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
aus Pferdeherz

Cytochrom *c* (iso-1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
aus *S. cerevisiae*

5.1.4 Säulenmaterial

DEAE-FF	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
DEAE Hyper D	Biosepra
PD-10 (Sephadex G-25)	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
BioRex	Biorad Laboratories GmbH, München
TSK-4000	Tosohaas

5.1.5 Lösungen

Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Färbelösung	Entfärbelösung	Lagerungslösung
0,1 % (w:v) Coomassie Blau R250	50% (v:v) Wasser	91 % (v:v) Wasser
50 % (v:v) Methanol	40 % (v:v) Methanol	7 % (v:v) Essigsäure
40 % (v:v) Wasser	10 % (v:v) Essigsäure	2 % (v:v) Glycerin
10 % (v:v) Essigsäure		

Proteinbestimmung

Assay Reagent A (Nr. 23223), Pierce, USA

Assay Reagent B (Nr. 23224), Pierce, USA

Lösungen für den Zellaufschluss von *S. cerevisiae*

Waschlösung 1:	Waschlösung2:	Aufschlusspuffer
10 mM EDTA	1.2 M Sorbit	650 mM Mannit
	100 mM Tris/HCl pH 7.5	50 mM KPi pH 7.4
	10 mM CaCl ₂	5 mM EDTA
		0.2 % (w:v) BSA

Puffer für die Solubilisierung und Reinigung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes

Solubilisierungspuffer

300 mM NaCl

50 mM KPi pH 6.9

0.1 % PMSF

DEAE-FF-Sepharose

Äquilibrierpuffer	Elutionsgradient
300 mM NaCl	350 mM-500mM NaCl
50 mM KPi pH 6.9	50 mM KPi pH 6.9
0.01 % (w:v) LM	0.015 % (w:v) LM

DEAE Hyper D

Verdünnungspuffer	Äquilibrierpuffer	Elutionspuffer
50 mM KPi pH 6.9	150 mM NaCl	150 mM-500 mM NaCl

0.015 % (w:v) LM	50 mM KPi pH 6.9	50 mM KPi pH 6.9
	0.015 % (w:v) LM	0.05 % (w:v) UM

Gelfiltration (TSK4000)

Äquilibrationspuffer

250 mM NaCl

20 mM KPi pH 7.5

0.05 % (w:v) UM

Lösungen für die Proteinkristallisation

Präzipitierlösung

100 mM Tris/HCl pH 8.0

0.05 % (w:v) UM

1 μ M Stigmatellin

Polyethylen 4000 (Konzentration von 8 bis 14 % (w:v))

5.2 Methoden

5.2.1 Proteinchemische Methoden

5.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BCA Protein Assay (Pierce) benutzt. Vor der Bestimmung wurden 50 Volumenteile der Lösung A mit einem Volumenteil der Lösung B gemischt. In eine Mikrotiterplatte wurden nebeneinander 0 bis 10 μ g BSA aus einer Stammlösung mit 1 mg/ml pipettiert. Die Proteinprobe wurde mit Wasser so vorverdünnt, dass ein bis drei μ l Lösung zwischen ein und 10 μ g Protein entsprachen. Zu den vorgelegten Standards bzw. Proben wurden dann 200 μ l BCA-

Reagenz pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben bei 562 nm photometrisch gemessen. Die Konzentration der Proteinproben wurde mit Hilfe einer linearen Regression der Standardwerte ermittelt.

5.2.1.2 Ultrafiltration von Proteinproben zur Erhöhung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrierung von Proteinproben wurden Ultrafiltrationseinheiten (Centriprep und Centricon von Amicon, Vivaspın von Vivascience) verwendet. Für den Cytochrom-*bc*₁-Komplex mit und ohne Fv-Fragment wurde eine Ausschlußgröße von 30 kDa verwendet. Für das Fv-Fragment alleine oder das Cytochrom *c* wurde eine Ausschlußgröße von 10 kDa verwendet.

5.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde soweit nicht anders beschrieben nach dem Protokoll von Fling und Gregerson durchgeführt. Die Proteinproben wurden in Reaktionsgefäßen mit Probenpuffer versetzt, so daß das Gesamtvolumen 20 µl nicht überschritt. Die Proben wurden für 30 min bei 40 °C inkubiert. Die Proben und der Molekulargewichtsstandard wurden mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen injiziert. Die Gelelektrophorese wurde bei Raumtemperatur bei einer Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Die Spannungsquelle wurde abgeschaltet, sobald die Laufront aus der Gelkassette austrat. Die Färbung der Gele erfolgte mit einer Färbelösung, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau enthielt (siehe unter Material).

5.2.1.4. Aufschluss der Zellen von *S. cerevisiae* und Präparation von Gesamtmembranen

Der Aufschluss der Zellen von *S. cerevisiae* erfolgte nach einem Protokoll von Carola Hunte. Die bei -75 °C gelagerten Hefezellen wurden mit heißem Wasser aufgetaut. Die Hefezellen wurden mittels Zentrifugation (10 min bei 5000 rpm Sorvall RC3BPlus) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 mM EDTA aufgenommen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in einem Puffer bestehend aus 1.2 M Sorbit, 100 mM Tris/HCl pH 7.5 und 10 mM CaCl₂ aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde gewogen, um das Nassgewicht an Hefezellen zu bestimmen. Vor dem Zellaufschluss wurde das Pellet in Aufschlusspuffer zu einer 35 %igen (w:w) Suspension resuspendiert und es wurden 139 mg PMSF, gelöst in 10 ml DMSO, zugesetzt.

Die Glaskugelmühle wurde bei laufendem Rotor (1000 rpm) mit 80 ml Glaskugeln (d=0,5 mm) gefüllt. Die mittels Wasserbad auf 4 °C temperierte Mühle wurde vollständig mit Aufschlusspuffer gefüllt. Die Hefezellen wurden dann bei einer Umdrehungszahl von 3000 rpm zwei aufeinanderfolgenden Mühlenläufen unterworfen. Die Aufschlussaubeute wurde durch Lichtmikroskopie abgeschätzt.

Die Mühle wurde dann mit 100 ml Puffer bestehend aus 50 mM KP_i, pH 7,4, 5 mM EDTA und 0.1 % PMSF nachgespült. Zum Sedimentieren von Zelltrümmern wurde das Mühleneluat dann einer Zentrifugation (25 min 6200 rpm 600xg GSA) unterzogen. Die Gesamtmembranen des Überstands wurden danach mittels Ultrazentrifugation (90 min 43.000 rpm 200.000xg 45Ti) pelletiert. Die Membranpellets wurden aliquotiert und bei -75 °C eingefroren.

5.2.1.5 Solubilisierung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae*

Zur Solubilisierung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wurden gefrorene Gesamtmembranen in Solubilisierungspuffer resuspendiert und es wurde 1.5 % (w:v) festes Detergenz (LM) zugesetzt. Die Lösung wurde bei 4 °C für ca. 45 min gerührt. Durch Ultrazentrifugation (35 min 43.000 rpm 200.000xg 45 Ti) wurden die nicht solubilisierten Bestandteile abgetrennt.

5.2.1.6 Reinigung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae*

Die Reinigung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie (Hunte *et al.*, 2000). Die Anionenaustauschersäule (DEAE-FF-Sephrose, Amersham-Pharmacia) wurde bei einer Flussrate von 1.6 ml/min mit ca. 200 ml Äquilibratorpuffer äquilibriert. Das Membransolubilisat wurde auf die Säule aufgetragen und danach mit Äquilibratorpuffer, der 0.015 % (w:v) LM enthielt, gewaschen. Die Elution des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes erfolgte dann mittels Salzgradient von 350 mM bis 500 mM NaCl. Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex in den Fraktionen des Eluates wurde anhand der roten Farbe identifiziert.

Zum Konzentrieren und der weiteren Reinigung des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes wurde eine zweite Anionenaustauschersäule (DEAE HyperD F, Biosepra) in Kombination mit einer HPLC Anlage (Biosys2000, Beckman) benutzt. Die Säule wurde mit Äquilibratorpuffer bei einer Flussrate von 2 ml/min vorbereitet. Die Probe wurde aufgetragen und die Säule mit 2 Säulenvolumen Äquilibratorpuffer gewaschen. Danach wurde durch Spülen mit 15 Säulenvolumen des Detergenzaustauschpuffers gewaschen. Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex wurde dann mit zwei sukzessiven Salzgradienten von 150 mM bis 200 mM NaCl und 200 mM bis 500 mM NaCl eluiert. Fraktionen, die den Cytochrom-*bc*₁-Komplex enthielten wurden mittels Ultrafiltration konzentriert.

5.2.1.7 Präparative Gelfiltration des Komplexes, bestehend aus Cytochrom-*bc*₁-Komplex und Fv-Fragment 18E11

Die präparative Gelfiltration des Komplexes aus Cytochrom-*bc*₁-Komplex und Fv-Fragment 18E11 erfolgte mit einer Gelfiltrationssäule (TSKgel G4000SW, Tosohaas) in Kombination mit der HPLC Anlage. Dazu wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Äquilibratorpuffer bei einer Flussrate von ca. 0,5 ml/min vorbereitet. 45 min vor Beginn des Gelfiltrationslaufes wurden 7 mg Cytochrom-*bc*₁-Komplex und 1 mg Fv-Fragment miteinander gemischt und mit Äquilibratorpuffer auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Probe wurde aufgetragen und Fraktionen, die den Komplex enthielten vereinigt. Die

vereinigten Fraktionen wurden dann mittels Ultrafiltration bis zur gewünschten Proteinkonzentration behandelt.

5.2.1.8 Derivatisierung des Cytochroms *c* (Isoform 1) von *S. cerevisiae* am Cystein102

Das Cytochrom *c* von *S. cerevisiae* besitzt ein Cystein nahe seines C-Terminus (Cystein102). Als Folge davon bildet das Protein in Lösung unter nicht-reduzierenden Bedingungen kovalente Homodimere (Busse *et al.*, 1990; Moench & Satterlee, 1995). Diese Dimerbildung muß für Kristallisationsexperimente unbedingt vermieden werden, da sonst mit Heterogenität der Probe zu rechnen ist. Zur Derivatisierung mit Methymethanthiosulfonat wurde das Protein in einem Puffer, bestehend aus 100 mM KP_i , pH 6,9 zu ca. 10 mg/ml gelöst. Durch Zusatz von 200 mM 2-Mercaptoethanol und einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde das Protein vollständig reduziert. Die Abtrennung des Reduktionsmittels erfolgte dann mit einer Gelfiltration über Sephadex G-25 (PD-10 Säule, Pharmacia), die mit 25 ml Puffer (100mM KP_i , pH 6,9) äquilibriert war. Alle roten Fraktionen wurden vereinigt und mit vierfachem molarem Überschuß an Methylnmethanthiosulfonat (MMTS) (100 mM in Wasser) versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Das überschüssige MMTS wurde mittels einer zweiten Gelfiltration (PD-10 Säule, Pharmacia) entfernt. Das Eluat dieser Gelfiltrationssäule wurde dann auf eine mit 50 mM HEPES/KOH pH 7.0 und 50 mM NaCl äquilibrierte Kationenaustauschersäule (BioRex-70, Biorad) aufgetragen. Das Protein wurde mit mehreren Säulenvolumen an Äquilibrierpuffer gewaschen. Die Reoxidation des Cytochrom *c* erfolgte dann durch Behandlung mit äquimolarer Menge an Kaliumhexacyanoferrat-(III). Das Protein wurde dann mit einem Salzgradienten von 100 mM bis 500 mM NaCl in 50 mM HEPES/KOH pH 7.0 eluiert. Es wurde nur die erste eluierte Proteinfraction gesammelt und per Ultrafiltration entsprechend konzentriert, da die zweite Proteinfraction vermutlich das Proteindimer enthält. Das Cytochrom *c* aus *S. cerevisiae* wurde auch mit einem Europium-Iodacetamido-Chelat (DELFLIA Eu-N1, Wallace) nach dem Protokoll des Herstellers derivatisiert.

5.2.1.9 Messung der Enzymaktivität des Cytochrom- bc_1 -Komplexes

Die Messung der Enzymaktivität des Cytochrom- bc_1 -Komplexes erfolgte durch zeitliche photometrische Messung der Absorptionszunahme bei 550 nm an einem SLM AMINCO DW-2000 Spektralphotometer. Zur Vermeidung von Messungenauigkeiten durch Schlierenbildung in der Küvette wurde mittels Doppelstrahlverfahren die zeitliche Änderung der Absorptionsdifferenz bei 550 nm und 539 nm bestimmt. Es wurden 50 μM Cytochrom c und 80 μM Ubichinol verwendet. Als Redox-Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung von Cytochrom c wurde ein Wert von $19.000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, für Cytochrom b wurde ein Wert von $28.500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ benutzt.

5.2.1.10 Erzeugung des proteingebundenen Semichinonradikals

Die Erzeugung des proteingebundenen Semichinonradikals erfolgte nach dem Protokoll von T'sai und Palmer (Siedow *et al.*, 1978; Rosa de la & Palmer, 1983). Dazu wurde der Cytochrom- bc_1 -Komplex aus der Anionenaustauscher-Chromatographie einer Umpufferung unterzogen. Dazu wurde eine Gelfiltrationssäule (PD-10, Pharmacia) mit 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 250 mM NaCl äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen und alle rötlichen Fraktionen wurden gesammelt. Die Proteinprobe wurde mit Ubichinon-30 Coenzym Q_6 (20 mM in DMSO) versetzt, so daß ein Verhältnis von Enzym zu Chinon von ca. 1:2 erreicht wurde. Nach dem Konzentrieren der Probe wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 500 bis 600 nm bei einer Schichtdicke von 2 mm ("Uvette", Eppendorf) gegen Wasser gemessen. Als Reduktionsmittel wurde Natriumdithionit (1mM oder 10 mM oder 100 mM), gelöst in 20 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (Natriumpyrophosphat), pH 8,0 (mit HCl eingestellt) und 250 mM NaCl, verwendet (Lambeth & Palmer, 1973). Dieser Puffer wurde vorher mit Hilfe einer Membranpumpe ca. 30 min lang entgast und dann mit Stickstoff gesättigt. Die Reduktion des Cytochrom- bc_1 -Komplexes erfolgte durch sukzessive Zugabe von jeweils einem μl Reduktionsmittel. Nach jeder Zugabe wurde der Redoxzustand der Hämgruppen durch Aufnahme eines Spektrums kontrolliert. Bei optimaler Reduktion des Cytochrom b (etwa gleich hohe Absorption des Cytochrom b bei 562 nm wie das Cytochrom c_1 bei 554 nm) wurde die

Probe sofort in ein EPR-Meßröhrchen überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur erfolgreichen Erzeugung des Semichinons war es essentiell, daß das Cytochrom *b* nicht vollständig reduziert war. Um dies zu überprüfen wurden in kurzem zeitlichen Abstand Spektren aufgenommen und die zeitliche Abnahme des Absorbtionssignals bei 562 nm ermittelt. Die so vorbereitete Probe wurde für die EPR-Spektroskopie eingesetzt.

Für das ENDOR-Experiment wurde das Enzym in deuterierte Lösung überführt. Dazu wurde die durch Ultrafiltration auf ca. 100 µl eingeeengte Probe mit einem Puffer bestehend aus 250 mM NaCl, 50 mM Tris/DCl pD=8,4 (mit DCl eingestellt) in D₂O ohne Zusatz von Detergens auf ca. 3ml verdünnt und erneut konzentriert. Durch einen weiteren Verdünnungsschritt und anschließendes Konzentrieren des Proteins wurde ein adäquater Proton/Deuteron-Austausch erreicht. Als Reduktionspuffer wurde ein Puffer bestehend aus 250 mM NaCl, 20 mM Natriumpyrophosphat pD 8,4 (mit DCl eingestellt) in D₂O benutzt.

5.2.2 Analyse der gebundenen Phospholipide im Cytochrom-*bc*₁-Komplex

5.2.2.1 Extraktion der Phospholipide aus den Membranproteinproben

Die Extraktion der Phospholipide aus den Membranproteinproben wurde nach dem Protokoll von Bligh und Dyer (Bligh & Dyer, 1959) vollzogen.

Dabei wurde zu einem Volumenteil wässriger Membranproteinprobe das 3,75 fache Volumen einer Lösung aus 2 Volumenteilen Methanol, 1 Volumenteil Chloroform und 5% (v:v) Salzsäure gegeben. Die Lösung wurde für ca. 15 s gemischt und die Phasen mittels Zentrifugation bei 1000 xg getrennt. Die obere wässrige Phase wurde entfernt, und es wurde jeweils ein Volumenteil an Chloroform und Wasser zugegeben. Diese Mischung wurde wieder für ca. 15 s gemischt und nach der Phasentrennung mittels Zentrifugation wurde wieder die obere Phase entfernt. Die gleiche Menge an Wasser wurde der unteren Phase zugegeben und es wurde wieder für ca. 15 s gemischt. Nach der

Phasentrennung mittels Zentrifugation wurde die obere Phase entfernt. Die untere Phase wurde dann als Probe für die Massenspektrometrie eingesetzt.

5.2.2.2 Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Analyse der Phospholipide in den Proben des Cytochrom- bc_1 -Komplexes wurden die Lipidextrakte der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie (DC) unterworfen. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Chloroform, Hexan, Methanol und Eisessig (50:30:10:5; v:v:v:v) benutzt. Die Färbung der getrennten Substanzen erfolgte durch Inkubation der DC-Platte in Coomassie-Färbelösung. Zur Sichtbarmachung der Substanzflecke wurde die DC-Platte danach in Entfärber-Lösung inkubiert.

Die Bestimmung relativer Anteile der Phospholipide in der Probe des Cytochrom- bc_1 -Komplexes nach der ersten Proteinreinigungsstufe (DEAE-FF-Sepharose-Säule) erfolgte durch zweidimensionale DC. Die Analyse wurde von Dr. Katleen Gura am IMB in Jena durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol und Ammoniaklösung (65:25:5; v:v:v) und in der zweiten Dimension mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol, Essigsäure, Wasser (80:12:15:4; v:v:v:v). Zur Sichtbarmachung der Substanzflecken wurde ein Molybdänblau-Spray benutzt (Hoischen *et al.*, 1997).

5.2.2.3 Analyse der Phospholipide mittels ESI-Massenspektrometrie

Die qualitative Analyse der am Cytochrom- bc_1 -Komplex gebundenen Phospholipide wurde mittels "Electro spray ionization" (ESI) Massenspektrometrie durchgeführt. Als Standards wurden Lösungen von Phospholipiden in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1 v:v) verwendet.

Die in Chloroform und Methanol gelösten Standards bzw. Proben wurden mit einer Mikroliterpipette in eine goldbedampfte Kapillare überführt. Diese wurde vor der Eintrittsöffnung des Massenspektrometers befestigt und es wurde eine Spannung von ca. -700 V angelegt. Die einzelnen Phospholipide können in der ESI-Massenspektrometrie

aufgrund ihrer unterschiedlichen Kopfgruppen sowohl als positiv geladene Molekülionen (durch Anlagerung eines Protons) als auch als negativ geladene Molekülionen (durch Abstraktion eines Protons) detektiert werden (Lehmann, 1996). Durch die relativ hohe Konzentration an Natriumchlorid in den Proben ist auch die Bildung von Molekülionen durch Anlagerung von Natrium bzw durch Anlagerung von Chlorid möglich (Murphy 1993, Lehmann *et al.*, 1997). Die Phospholipide der inneren Mitochondrienmembran aus *S. cerevisiae* haben als Fettsäurekomponenten meist einfach ungesättigte C₁₆-Fettsäuren (Palmitoleinsäure) oder C18-Fettsäuren (Ölsäure). Zur Identifizierung der Phospholipide wurden daher die Massen aller möglichen Molekülionen der Phospholipidspezies errechnet (siehe Tab. 16-21). Die molekularen Spezies der einzelnen Phospholipide werden anhand ihrer Fettsäurezusammensetzung mit zwei Zahlen (Beispiel 32:2) gekennzeichnet. Die erste Zahl bezeichnet die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuren, die zweite Zahl bezeichnet die Gesamtzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren.

Tab.16: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Phosphatidylcholin (PC) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

PC Molekülionen	Spezies mit 32:2	Spezies mit 34:2	Spezies mit 36:2
[M+H] ⁺	731	759	787
[M+Na] ⁺	753	781	809
[M+2Na-H] ⁺	775	803	831
[M+Cl] ⁻	765	793	821
[M+15] ⁻	714	742	770
[M+60] ⁻	669	697	725
[M+86] ⁻	643	671	699

Tab.17: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Phosphatidylethanolamin (PE) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

PE Molekülionen	Spezies mit 32:2	Spezies mit 34:2	Spezies mit 36:2
[M+H]⁺	688	716	744
[M+Na]⁺	710	738	766
[M+2Na-H]⁺	732	760	788
[M-H]⁻	686	714	742
[M+Cl]⁻	723	751	779

Tab. 18: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Cardiolipin (CL) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

CL Molekülionen	Spezies mit 64:4	Spezies mit 66:4	Spezies mit 68:4	Spezies mit 70:4	Spezies mit 72:4
[M+H]⁺	1347	1375	1403	1431	1458
[M+Na]⁺	1369	1397	1425	1453	1481
[M+2Na-H]⁺	1391	1419	1447	1475	1503
[M-H]⁻	1345	1373	1401	1429	1457
[M-2H]²⁻	672	686	700	714	728

Tab. 19: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Phosphatidylinosit (PI) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

PI Molekülionen	Spezies mit 32:2	Spezies mit 34:2	Spezies mit 36:2
[M+H]⁺	807	835	863
[M+Na]⁺	829	857	885
[M+2Na-H]⁺	851	879	907
[M-H]⁻	805	833	861

Tab.20: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Phosphatidylserin (PS) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

PS Molekülionen	Spezies mit 32:2	Spezies mit 34:2	Spezies mit 36:2
[M+H]⁺	732	760	788
[M+Na]⁺	754	782	810
[M+2Na-H]⁺	776	804	832
[M-H]⁻	730	758	786
[M+Cl]⁻	766	794	822

Tab.21: Auflistung der Massen aller möglichen Molekülionen für Phosphatidsäure (PA) mit Palmitoleinsäure und Ölsäure.

PA Molekülionen	Spezies mit 32:2	Spezies mit 34:2	Spezies mit 36:2
[M+H]⁺	645	673	701
[M+Na]⁺	667	695	723
[M+2Na-H]⁺	689	717	745
[M-H]⁻	643	671	699

Zusätzlich zu den Phospholipiden ist die Anwesenheit der Detergenzien Dodecylmaltosid, Undecylmaltosid, des Inhibitors Stigmatellin, des Substrates Coenzym Q₆, des Membranbestandteils Ergosterol und des Cytochrom *b* Häms zu erwarten. Tabelle 22 zeigt die für diese Substanzen typischen Kationen und Anionen.

Tab. 22: Auflistung der Massen der möglichen Molekülionen für Häm, Dodecyl-maltosid (LM), Undecyl-maltosid (UM), Stigmatellin (Stig), Coenzym Q₆ (UQ6) und Ergosterol (Erg).

Molekül- ionen	Häm	LM	UM	Stig	UQ6	Erg
[M+H]⁺	617	511	497	515	591	397
[M+Na]⁺	639	533	519	537	613	419

$[M_2+H]^+$	1233	1021	993	1029	1181	793
$[M_2+Na]^+$	1255	1043	1015	1051	1203	815
$[M-H]^-$	615	509	495	513	589	395
$[M+Cl]^-$	651	545	531	549	625	431
$[M_2+H]^-$	1231	1019	991	1027	1179	791
$[M_2+Cl]^-$	1267	1055	1027	1063	1215	827

5.2.2.4 Identifizierung der Phospholipide anhand ihrer charakteristischen Fragmentierungen mittels Tandem-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der einzelnen Phospholipide wurden Phospholipidstandards (DOPE, DOPC, TOCL und PI aus Sojabohnen) benutzt. Die eindeutige Identifizierung der Phospholipide anhand ihrer Ionenmassen wird durch das Vorhandensein von Ionen gleicher Masse (isobarer Ionen) erschwert. Mittels Tandem-Massenspektrometrie wurden die jeweiligen Molekülionen in einer Ionenfalle mit angeregtem Heliumgas fragmentiert und die Masse der dabei erhaltenen Molekülbruchstücke wurden gemessen. Diese Fragmente dienen der Identifizierung sowohl der Kopfgruppe des Phospholipids als auch dessen Fettsäurezusammensetzung. Dadurch konnten die in der Probe vorkommenden molekularen Spezies eines Phospholipids bestimmt werden.

5.2.3 Proteinkristallographische Methoden

5.2.3.1 Proteinkristallisation

Die Theorie und Praxis der drei-dimensionalen Kristallisation von Proteinen ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden (Ducruix & Giegé, 1992; McPherson, 1999). Die Besonderheiten bei der drei-dimensionalen Kristallisation von Membranproteinen

ergeben sich durch die Anwesenheit von Detergens und sind ebenfalls in der Literatur beschrieben worden (Michel, 1983; Michel, 1991; Ostermeier & Michel, 1997).

5.2.3.1.1 Kristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der Cytochrom-*bc*₁-Komplex wurde mit der Methode der isothermen Wasserdampfdiffusion (vapour-diffusion method) kristallisiert. Dabei kamen die Varianten des sitzenden und des hängenden Tropfens (sitting drop/ hanging drop) zum Einsatz.

Bei der Variante des hängenden Tropfens wurde ein Volumenteil (gewöhnlich 2 µl) der auf 50 mg/ml konzentrierten Proteinlösung auf silanisierte Deckgläschen pipettiert. Durch schnelles Mischen mit einem halben Volumenteil Präzipitierlösung wurde die erforderliche Konzentration an Polyethylenglycol eingestellt (Hunte *et al.*, 2000). Die Deckgläschen wurden dann jeweils, mit dem Proteintropfen nach unten, luftdicht über Vertiefungen einer Zellkulturplatte (24 well plate) befestigt, die einen ml Bodenlösung enthielt. Die Temperatur während des Kristallisationsexperiments betrug 4 °C. Nach Beendigung des Kristallwachstums wurden die Kristalle in Stabilisierungspuffer überführt.

5.2.3.1.2 Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes mit Cytochrom *c*

Cytochrome vom *c*-Typ sind mit verschiedenen Redoxpartnern kokristallisiert worden (Adir *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1994, Pelletier & Kraut, 1992, Poulos *et al.*, 1987). Ein Protokoll zur Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *Bos taurus* mit Cytochrom *c* ist in der Literatur beschrieben worden (Yu *et al.*, 1996).

Die Kokristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae* und des Cytochroms *c* aus *S. cerevisiae* wurde unter Bedingungen vorgenommen, die gegenüber der in der Literatur beschriebenen Kristallisation des Cytochrom-*bc*₁-Komplexes (Hunte

et al., 2000) leicht verändert war. Dazu wurde der binäre Komplex bestehend aus Cytochrom- bc_1 -Komplex und Fv-Fragment 18E11 mit Cytochrome c in leicht überstöchiometrischer Menge versetzt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Ultrafiltration auf 50 mg/ml eingestellt. Danach wurde mit detergenzhaltigem Wasser die Ionenstärke auf einen physiologisch relevanten Wert erniedrigt. Dadurch sollte die Bindung des Substrats an das Enzym gewährleistet werden. Eine Abtrennung des überschüssigen Cytochrom c wurde aufgrund der bekannten hohen Dissoziationskonstanten für Komplexe anderer Cytochrom- bc_1 -Komplexe mit Cytochrom c (Pettigrew & Moore, 1987) nicht vorgenommen.

Bei der Kristallisation kamen die Varianten des hängenden und des sitzenden Tropfens der isothermen Dampfdiffusionsmethode zur Anwendung. Ähnlich wie bei der Kristallisation des Cytochrom- bc_1 -Komplexes ohne Cytochrom c wurde auch hier die Proteinlösung durch schnelles Mischen mit Präzipitierlösung mit der entsprechenden Konzentration an Polyethylenglycol versetzt.

5.2.3.3 Strukturlösung durch molekularen Ersatz

Die Struktur des Komplexes aus Cytochrom- bc_1 -Komplexes und Cytochrom c wurde durch molekularen Ersatz mit der Software AMORE (Navazza, 1994) gelöst.

5.2.3.4 Verfeinerung von Proteinstrukturen

Proteinstrukturen wurden mit der Software CNS (Version 0.4 bzw. 1.0) (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert. Die Verfeinerung erfolgte durch rigide Körperverfeinerung (rigid body refinement), Positionsverfeinerung (positional) und individuelle Temperaturfaktor-Verfeinerung. Stereochemische Parameter für die Proteinmodelle entsprachen denen von Engh und Huber verwendeten (Engh & Huber, 1991). Als Parameter für Redox-Kofaktoren, Ubichinon und Stigmatellin wurden die von Lancaster und Michel publizierten benutzt. Parameter für Lipidmoleküle wurden mit dem Programm XPLOR2D (Kleywegt & Jones, 1997) erzeugt.

5.2.3.5 Berechnung von Elektronendichtekarten

Elektronendichtekarten wurden mit Hilfe der Software CNS (Version 0.4 bzw 1.0) (Brünger *et al.*, 1998) berechnet. Die Interpretation von Elektronendichtekarten und manuelle Veränderungen an Strukturmodellen (Proteine und Kofaktoren) wurden mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt.

5.2.3.6 Berechnung von Oberflächen in Proteinkomplexen

Die Berechnung der Größe von Oberflächen von Proteinen erfolgte mit dem Programm NACCESS (Hubbard *et al.*, 1991). Die Berechnung der Interaktionsfläche zwischen zwei Proteinen wurde berechnet als Differenz zwischen der Summe der Einzeloberflächen beider Proteine und der Oberfläche des Komplexes aus den beiden Proteinen (Lo Conte *et al.*, 1999).

5.2.3.7 Graphische Darstellung von Proteinoberflächen

Die Darstellung von Proteinoberflächen und deren Eigenschaften erfolgte mit der Software GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). Für die Einstufung der Aminosäurereste nach Hydrophobizität wurde ein Für die Darstellung des elektrostatischen Potentials auf den Oberflächen von Cytochrom c_1 und Cytochrom c wurde Lysin- und Argininresten eine volle positive Ladung zugeordnet, Aspartat- und Glutamatresten wurde eine volle negative Ladung zugeordnet. Für die Berechnung der Dipolmomente des Cytochrom c und des Cytochrom c_1 wurde eine erweiterte Datei mit Partialladungen sowie Ladungen für die Hämgruppe benutzt.

5.2.3.8 Erstellung von Aminosäuresequenzvergleichen

Für die Erstellung von Aminosäuresequenzvergleichen (*sequence alignments*) wurden die Programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) und ALSCRIPT (Barton, 1993)

benutzt. Die Eingabesequenzen für die mitochondrialen Proteine aus *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Euglenia gracilis*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Klyuveromyces marxianus*, *Klyuveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden Aminosäuresequenz-Datenbanken (Swiss-Prot-Database) für entnommen. Identische Aminosäurereste wurden blau gefärbt, solche Reste, die konserviert ersetzt waren wurden türkis gefärbt. Die Nummerierung der Sequenzen des Cytochrom c_1 erfolgte nach der Sequenz des Cytochrom c_1 aus *S. cerevisiae*

5.2.3.9 Berechnung von Elektronentransfer-Raten aus Strukturdaten

Ausgehend von den Strukturdaten des Cytochrom- bc_1 -Komplexes mit gebundenem Cytochrom c wurden Parameter für den Elektronentransfer zwischen den Redoxzentren mit Hilfe des Programms "et-rates package" von Dutton und Mitarbeitern (Page *et al.*, 1999) berechnet. Als Kanten der Redoxzentren wurden für Häm-Gruppen die unsubstituierten Porphyrine eingesetzt, für das Eisen-Schwefel-Zentrum wurde das unligandierte Zentrum eingesetzt. Als Position für das gebundene Ubichinol an der Q_o -Stelle wurde der Ring des Stigmatellins mit den Sauerstoffatomen O4 und O8 (Hunte *et al.*, 2000) benutzt, im Falle des Ubichinons an der Q_i -Stelle wurde der unsubstituierte Benzochinonring eingesetzt. Die logarithmierten Werte der optimierten Raten $\log k^*$ wurden mit dem Program "et-rates adjustor" (http://www.med.upenn.edu/~biocbiop/local_pages/dutton_lab/golden.html) in die finalen Raten des Elektronen-Transfers umgerechnet. Als Werte für die Reorganisationsenergie wurden $\lambda=0,7$ eV bzw. $\lambda=1$ eV angenommen. Die Mittelpunktspotentiale der Redox-Zentren des Cytochrom- bc_1 -Komplexes (T'sai & Palmer, 1983, Kauten *et al.*, 1987) sowie für das Cytochrom c (Cutler *et al.*, 1987) wurden in Werte für die freie Reaktionsenthalpie ΔG_R umgerechnet ($\Delta G_R = -n \cdot F \cdot \Delta E$). Für die Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums wurde Ubichinol als Elektronendonator angenommen, während für die Reduktion des Häm b_L Ubisemichinon als Elektronendonator eingesetzt wurde.

6 Literatur

- Adir, N., Axelrod, H.L., Beroza, P., Isaacson, R.A., Rongey, S.H., Okamura, M.Y. & Feher, G. (1996) Co-crystallization and Characterization of the Photosynthetic Reaction Center-Cytochrome c_2 Complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **35**, 2535-2547.
- Ambler, R.P. (1982) in: From Cyclotrones to Cytochromes, Kaplan, N.O. & Robinson, A. (Hrsg.), Academic Press, New York, 263-280.
- Azzi, A., Bill, K. & Broger, C. (1982) Affinity chromatography purification of cytochrome *c* binding enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2447-2450.
- Banci, L., Bertini, I., Bren, K.L., Gray, H.B., Sompornpisut, P. & Turano, P. (1997) Solution structure of Oxidized *Saccharomyces cerevisiae* Iso-1-cytochrome *c*. *Biochemistry* **36**, 8992-9001.
- Barker, P.D., Bertini, I., Del Conte, R., Ferguson, S.J., Hajieva, P., Tomlinson, E., Turano, P. & Viezzoli, S. (2001) A further clue to understanding the mobility of mitochondrial yeast cytochrome *c*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4468-4476.
- Barton, G.J. (1993) ALSCRIPT a tool to format multiple sequence alignments. *Prot. Engineer.* **6**, 37-40.
- Berghuis, A.M. & Brayer, G.D. (1992) Oxidation State-dependent Conformational Changes in Cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* **223**, 959-976.
- Berry, E.A., Zhang, Z., Huang, L.S. & Kim, S.H. (1999) Structures of quinone-binding sites in *bc* complexes: functional implications. *Biochem. Soc. Trans.*, **27**, 565-572.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. & Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 1005-1075.
- Beyer, K. & Nuscher, B. (1996) Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry*, **35**, 15784-15790.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Bone, R., Frank, L., Springer, J.P., Pollack, S.J., Osborne, S.A., Atack, J.R., Knowles, M.R., McAllister, G., Ragan, C.I., Broughton, H.B., Baker, R. & Fletcher, S.R.

- (1994) Structural analysis of inositol monophosphatase complexes with substrates. *Biochemistry* **33**, 9460-9467.
- Boumans, H., Berden, J.A. & Grivell, L.A. (1997) The role of subunit VIII in the structural stability of the bc_1 complex from *Saccharomyces cerevisiae* studied using hybrid complexes. *Eur. J. Biochem.* **249**, 762-769.
- Boumans, H., Grivell, L.A. & Berden, J.A. (1998) The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit. *J. Biol. Chem.* **273**, 4872-4877.
- Brandt, U. & Okun, J.G. (1997) Role of Deprotonation Events in Ubihydroquinone:Cytochrome *c* Oxidoreductase from Bovine Heart and Yeast Mitochondria. *Biochemistry* **36**, 11234-11240.
- Brandt, U., Uribe, S., Schägger, H. & Trumpower, B.L. (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8,5 kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 12947-12953.
- Brandt, U. & Trumpower, B.L. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **29**, 165-197.
- Brasseur & Brivet-Chevillotte (1995) Characterization of mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the quinone reductase site (Q_N). *Eur. J. Biochem.* **230**, 1118-1124.
- Brasseur, G., Saribas, A.S. & Daldal, F. (1996) A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial bc_1 complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 61-69.
- Broger, C., Salardi, S. & Azzi, A. (1983) Interaction Between Isolated Cytochrome c_1 and Cytochrome *c*. *Eur. J. Biochem.* **131**, 349-352.
- Bruel, C., Brasseur, R. & Trumpower, B.L. (1996) Subunit 8 of the *Saccaromyces cerevisiae* cytochrome bc_1 complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 59-68.
- Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T. & Lehmann, W.D. (1997) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2339-2344.

- Brumme, S., Kruft, V., Schmitz, U.K. & Braun, H.P. (1998) New insights into the co-evolution of cytochrome *c* reductase and the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 13143-13149.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998) Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54**, 905-921.
- Busse, S.C., Moench, S.J. & Satterlee, J.D. (1990) One- and two-dimensional proton NMR studies of cys-102 S-methylated yeast isozyme-1 ferricytochrome *c*. *Biophys. J.* **58**, 45-51
- Castresana, J. & Saraste, M. (1995) Evolution of energetic metabolism: the respiration early hypothesis. *TIBS* **20**, 443-448.
- Castresana, J., Lübben, M. & Saraste, M. (1995) New archaeobacterial genes coding for redox proteins: implications for the evolution of aerobic metabolism. *J. Mol. Biol.* **250**, 202-210.
- Chen, L., Durley, R.C., Mathews, F.S. & Davidson, V.L. (1994) Structure of an electron transfer complex: methylamine dehydrogenase, amicyanin, and cytochrome *c*551i. *Science* **264**, 86-90.
- Cocco, T., Lorusso, M., Sardanelli, A.M., Minuto, M., Ronchi, S., Tedeschi, G. & Papa, S. (1991) Structural and functional characteristics of polypeptide subunits of the bovine heart ubiquinol-cytochrome-*c* reductase complex. *Eur. J. Biochem.* **195**, 731-734.
- Crofts, A.R., Hong, S.J., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova Kuras, M. & Berry, E.A. (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the *bc*₁ complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10021-10026.
- Cruciat, C.-M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. & Stuart, R.A. (2000) The Cytochrome *bc*₁ and Cytochrome *c* Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275**, 18093-18098.

- Cruciat, C.-M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W. & Stuart, R. (1999) Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc*₁ complex. *EMBO J.* **18**, 5226-5233.
- Cutler, R.L., Pielack, G.J., Mauk, A.G. & Smith, M.. (1987) Replacement of cystein-107 of *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome *c* with threonine: improved stability of the mutant protein. *Protein Engineering* 1 (2), 95-99.
- Daum, G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 1-42.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. & Dickson, R. (1998) Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471-1510.
- Degli Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. & Meyer, A. (1993) Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 243-271.
- Deisenhofer, J. & Michel, H. (1989) Das photosynthetische Reaktionszentrum des Purpurbakteriums *Rhodopseudomonas viridis* (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **101**, 872-892.
- Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A. & Margoliash, E. (1971) Ferricytochrome *c*. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **246**, 1511-1535.
- Döpner, S., Hildebrandt, P., Federico, I.R., Mauk, A.G., von Walter, M., Buse, G. & Soulimane, T. (1999) The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome *c* in the electron transfer to cytochrome *c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* **261**, 379-391.
- Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why Are There So Many Lipids? *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 199-232.
- Drachev, L.A., Kaurov, B.S., Mamedov, M.D., Mulkidjanian, A.Ya., Semenov, A.Yu., Shinkarev, V.P., Skulachev, V.P. & Verkhovsky, M.I. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction centre and *bc*₁ complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 189-197.
- Ducruix, J.P. & Giegé, R. (1992) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. *IRL Press, Oxford University Press, New York*.

- Engh, R.A. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst. A* **47**, 392-400.
- Esnouf, R.M. (1999) Further additions to Molscript Version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallogr. D* **55**, 938-940.
- Essen, L.-O., Siegert, R., Lehmann, W.D. & Oesterhelt, D. (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **95**, 11673-11678.
- Fisher, N. & Rich, P. (2000) A Motif for Quinone Binding Sites in Respiratory and Photosynthetic Systems. *J. Mol. Biol.* **296**, 1153-1162.
- Flocco, M.M. & Mowbray, S.L. (1994) Planar Stacking Interactions of Arginine and Aromatic Side-Chains in Proteins. *J. Mol. Biol.* **235**, 709-717.
- Fyfe, P.K., McAuley, K.E., Roszak, A.W., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. & Jones, M.R. (2001) Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 106-112.
- Fry, M. & Green D.E. (1981) Cardiolipin Requirement in Complex I and III of the Mitochondrial Respiratory Chain. *J. Biol. Chem.* **256**, 1874-1880.
- Gomez Jr., B. & Robinson, N.C. (1999) Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome *bc*₁. *Biochem.* , **38**, 9031-9038
- Grandier-Vazeille X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S. & Schmitter, J.-M. (2001) Yeast Mitochondrial Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex. *Biochemistry* **40**, 9758-9769.
- Gray, H.B. & Winkler, J.R. (1996) Electron Transfer in Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 537-561.
- Gray, K.A., Dutton, P.L. & Daldal, F. (1994) Requirement of histidine 217 for ubiquinone reductase activity (Q_i site) in the cytochrome *bc*₁ complex. *Biochemistry* **33**, 723-733.
- Grimaldi, S., McMillan, F., Ostermann, T., Ludwig, B., Michel, H. & Prisner, T. (2001) Q_H[•] Ubisemiquinone Radical in the *bo*₃-Type Ubiquinol Oxidase Studied by Pulsed Electron Magnetic Resonance and Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 1037-1043.

- Gupte, S.S. & Hackenbrock, C.R. (1988a) Multidimensional Diffusion Modes and Collision Frequencies of Cytochrome *c* with Its Redox Partners. *J. Biol. Chem.* **263**, 5241-5247.
- Gupte, S.S. & Hackenbrock, C.R. (1988b) The Role of Cytochrome *c* Diffusion in Mitochondrial Electron Transport. *J. Biol. Chem.* **263**, 5248-5253.
- Gutweniger, H.E., Grassi, C. & Bisson, R. (1983) Interaction between Cytochrome *c* and Ubiquinone-Cytochrome *c* Oxidoreductase: A study with water-soluble carbodiimides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **116**, 272-283.
- Hacker, B., Barquera, B., Crofts, A.R. & Gennis, R.B. (1993) Characterization of Mutations in the Cytochrome *b* Subunit of the *bc*₁ Complex of *Rhodobacter sphaeroides* That Affect the Quinone Reductase Site (Q_c). *Biochemistry* **32**, 4403-4410.
- Hampsey, D.M., Das, G. & Sherman, F. (1986) Amino Acid Replacements in Yeast Iso-1-cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **261**, 3259-3271.
- Hanekop, N. (2000) Phospholipidbindung im Cytochrom *bc*₁ Komplex. Diplomarbeit, Universität Frankfurt am Main.
- Hatefi, Y. & Rieske, J.S. (1967) The preparation and properties of DPNH-cytochrome *c* reductase (complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol.* **10**, 225-231.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.
- Hayer-Hartl, M., Schägger, H., von Jagow, G. & Beyer, G.K. (1992) Interactions of phospholipids with the mitochondrial cytochrome-*c* reductase studied by spin-label ESR and NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* , **209**, 423-430.
- Hazzard, J.T., Rong, S.-Y. & Tollin, G. (1991) Ionic Strength Dependence of the Kinetics of Electron Transfer from Bovine Mitochondrial Cytochrome *c* to Bovine Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry* **30**, 213-222.
- Heacock, D.H., Liu, R.Q., Yu, C.-A., Yu, L., Durham, B. & Millet, F. (1993) Intracomplex Electron Transfer between Ruthenium-Cytochrome *c* Derivatives and Cytochrome *c*₁. *J. Biol. Chem.* **268**, 27171-27175.
- Hoch, F.L. (1992) Cardiolipin and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 71-133.

- Hoischen, C., Gura, K., Luge, C. & Gumpert, J. (1997) Lipid and fatty acid composition of cytoplasmic membranes from *Streptomyces hygroscopicus* and its stable protoplast-type L form. *J. Bacteriol.* **179**, 3430-3436.
- Huang, Y., Beeser, S., Guillemette, J.G., Storms, R.K. & Kornblatt, J.A. (1994) Mutations of iso-1-cytochrome *c* at position 13 and 90: Seperate effects on physical and functional properties. *Eur. J. Biochem.* **223**, 155-160.
- Hubbard, S.J. Campell, S.F. & Thornton, J.N. (1991) Molecular Recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine protease inhibitors. *J. Mol. Biol.* **220**, 507-530.
- Hübner, W., Mantsch, H.H. & Kates, M. (1991) Intramolecular hydrogen bonding in cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 166-174.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T. & Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevesiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**, 669-684.
- Hunte, C. (2001) Insights from the structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments. *FEBS Lett.*, **25152**, 1-7.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. & Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Science*, **281**, 64-71.
- Jagow von, G. & Link, T.A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc*₁ complex. *Methods Enzym.* **126**, 253-271.
- Jensen, N.J., Kenneth, B.T. & Gross, M.L. (1987) FAB MS/MS for Phosphatidylinositol, -glycerol, -ethanolamin and Other Complex Phospholipids. *Lipids* **22**, 480-489.
- Jensen, N.J., Tomer, K.B. & Gross, M.L. (1986) Fast atom bombardment and tandem mass spectrometry of phosphatidylserine and phosphatidylcholine. *Lipids* **21**, 580-588.
- Jiang, F., Ryan, M.T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. & Greenberg, M.L. (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem.* **275(29)**, 22387-94.

- Jones, A., Zou, J.-Y., Cowan, S. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors within these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110-119.
- Josef-Horne, T., Hollomon, D.W. & Wood, P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 179-195.
- Karlsson, B., Hovmöller, S., Weiss, H. & Leonard, K. (1983) Structural studies of cytochrome reductase. Subunit topology determined by electron microscopy of membrane crystals of a subcomplex. *J. Mol. Biol.* **165**, 287-302.
- Kates, M., Syz, J.-Y., Gosser, D. & Haines, T.H. (1993) pH-Dissociation Characteristics of Cardiolipin and its 2'-Deoxy Analogue. *Lipids* **28**, 877-882.
- Kim, C.H. & King, T.E. (1983) A mitochondrial protein essential for the formation of the cytochrome c_1 - c complex. Isolation, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **258**, 13543-13551.
- Kim, C.H., Balny, C. & King, T.E. (1987) Role of the hinge protein in the electron transfer between cardiac cytochrome c_1 and c . Equilibrium constants and kinetic probes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8103-8108.
- Kleywegt, G.T. & Jones, T.A. (1997) Model-building and refinement practice. *Meth. Enzymol.* **277**, 208-230.
- Komar-Panicucci, S., Sherman, F. & McLendon, G. (1996) Modulated Growth of *Saccharomyces cerevisiae* by Altering the Driving Force of the Reactions of Cytochrome c : Marcus' Theory *in Vitro* and *in Vivo*. *Biochemistry* **35**, 4878-4885.
- Koshkin, V. & Greenberg ML. (2000) Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J.* **347**, 687-91.
- Kraulis, P.J. (1991) MolScript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Lancaster, C.R.D. & Michel, H. (1997) The coupling of light-induced electron transfer and proton uptake as derived from crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* modified at the binding site of the secondary quinone, Q_B . *Structure* **5**, 1339-1359.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , **227**, 680-685.

- Lambeth, D.O. & Palmer, G. (1973) The Kinetics and Mechanism of Reduction of Electron Transfer Proteins and other Compounds of Biological Interest by Dithionite. *J. Biol. Chem.* **248**, 6095-6103.
- Land, E.J. & Swallow, A.J. (1970) One-Electron Reactions in Biochemical Systems As Studied by Pulse Radiolysis. *J. Biol. Chem.* **245**, 1890-1894.
- Lange, C. & Hunte, C (2001) Rapid reduction of cytochrome *c* by cytochrome *bc*₁ complex and its half-of-the sites binding. Eingereicht bei *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L. & Hunte, C. (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc*₁ complex structure. *The EMBO J.*, (akzeptiert).
- Lehmann, W.D. (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Lehmann, W.D., Köster, M., Erben, G. & Keppler, D. (1997) Characterization and quantification of rat bile phosphatidylcholine by electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **246**, 102-110.
- Lewis, BA & Engelman, DM (1983) Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166**, 211-217.
- Linke, P., Beckmann, G., Gothe, A. & Weiss, H. (1986) Dimeric ubiquinol:cytochrome *c* reductase of *Neurospora* mitochondria contains one cooperative Ubiquinone-reduction centre. *Eur. J. Biochem.* **158**, 615-621.
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999) The Atomic Structure of Protein-Protein Recognition Sites. *J. Mol. Biol.* **285**, 2177-2198.
- Loon van, A.P.G.M., Groot de, R.J., Haan de, M., Dekker, A. & Grivell, L.A. (1984) The DNA sequence of the nuclear gene coding for the 17-kD subunit VI of the yeast ubiquinol-cytochrome *c* reductase: a protein with an extremely high content of acidic amino acids. *EMBO J.* **3**, 1039-1043.
- Louie, G.V. & Brayer, G.D. (1990) High-resolution Refinement of Yeast Iso-1-Cytochrome *c* and Comparisons With Other Eukaryotic Cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* **214**, 527-555.

- Louie, G.V., Hutcheon, W.L.B. & Brayer, G.D. (1988) Yeast iso-1 cytochrome *c*: a 2.8 Å resolution three-dimensional structure determination. *J. Mol. Biol.* **199**, 295-314.
- Malaney, S., Trumpower, B.L., Deber, C.M. & Robinson, B.H. (1997) The N terminus of the Qcr7 protein of the cytochrome *bc*₁ complex is not essential for import into mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* but is essential for assembly of the complex. *J. Biol. Chem.* **272**, 17495-17501.
- Margoliash, E. & Bosshard, H.R. (1983) Guided by electrostatics, a textbook protein comes of age. *TIBS* **8**, 316-320.
- McAuley, K.E., Fyfe, P.K., Ridge, J.P., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. & Jones, M.R. (1999) Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14706-14711.
- McPherson, A. (1999) Crystallization of Biological Macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Meinhardt, S.W. & Ohnishi, T. (1992) Determination of the position of the Q_i⁻ quinone binding site from the protein surface of the cytochrome *bc*₁ complex in *Rhodobacter capsulatus* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**, 67-74.
- Meinhardt, S.W., Yang, X.H., Trumpower, B.L. & Ohnishi, T. (1987) Identification of a stable ubisemiquinone and characterization of the effects of ubiquinone oxidation-reduction status on the Rieske iron-sulfur protein in the three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **262**, 8702-8706.
- Meyer, T.E., Zhao, Z.G., Cusanovich, M.A. & Tollin, G. (1993) Transient Kinetics of Electron Transfer from a Variety of *c*-Type Cytochromes to Plastocyanin. *Biochemistry* **32**, 4552-4559.
- Michel, H. (1983) Crystallization of membrane proteins. *TIBS* **8**, 56-59.
- Michel, H. (1991) Crystallization of Membrane proteins. *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- Mitchell, P. (1975a) Protonmotive Redox Mechanism of the Cytochrome *b-c*₁ complex in the Respiratory Chain: Protonmotive Ubiquinone Cycle. *FEBS Lett.* **56**, 1-6.
- Mitchell, P. (1975b) The protonmotive Q Cycle: A General Formulation *FEBS Lett.* **59**, 137-139.

- Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* **62**, 327-367.
- Mizushima, T., Yao, M., Inoue, N., Aoyama, H., Yamashita, E., Yamaguchi, H., Tsukihara, T., Nakashima, R., Shinzawa-Itoh, K., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1999) Structure of phospholipids in a membrane protein complex, bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Acta Crystallogr.* , **A55** (Suppl. Abstr.) P06.04.069
- Moench, S. J. & Satterlee, J.D. (1995) A Comparison of Spectral and Physicochemical Properties of Yeast Iso-1-Cytochrome *c* and Cys 102-Modified Derivatives of the Protein. *J. Prot. Chem.* **14**, 567-582.
- Moore, G.R. & Pettigrew, G.W. (1990) Cytochromes *c*: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. *Springer Series in Molecular Biology, Springer Verlag, Berlin*.
- Mulkidjanian, A.Y., Mamedov, M.D., Semenov, A.Y., Shinkarev, V.P., Verkhovsky, M.I. & Drachev, L.A. (1990) Partial reversion of the electrogenic reaction in the ubiquinol:cytochrome *c*₂-oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores under neutral and alkaline conditions. *FEBS Lett.* **277**, 127-130.
- Murphy, M.E.P., Nall, B.T. & Brayer, G.D. (1992) Structure Determination and Analysis of Yeast Iso-2-cytochrome *c* and a Composite Mutant Protein. *J. Mol. Biol.* **227**, 160-176.
- Murphy, R.C. (1993) Mass Spectrometry of Lipids. *Handbook of Lipid Research*, Plenum Press, New York.
- Nakai, M., Endo, T., Hase, T., Tanaka, Y., Trumpower, B.L., Haruko, I., Asada, A., Bogaki, M. & Matsubara, H. (1993) Acidic Regions of Cytochrome *c*₁ Are Essential for Ubiquinol-Cytochrome *c* Reductase Activity in Yeast Cells Lacking the Acidic QCR6 Protein. *J. Biochem.* **114**, 919-925.
- Navaza, J. (1994) AMORE – an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* **50**, 157-163.
- Nett, J.H., Hunte, C. & Trumpower, B.L. (2000) Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome *bc*₁ complex. *Eur. J. Biochem.* , **267**, 5777-5782.

- Nicholls, A., Sharp, K. & Honig, B.H. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **11**, 281-296.
- Nicholls, P. (1974) Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 271-310.
- Ochi, H., Hata, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Sakurai, T., Aihara, S. & Morita, Y. (1983) Structure of rice ferricytochrome *c* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **166**, 407-418.
- Ohnishi, T. & Trumpower, B.L. (1980) Differential effects of antimycin on ubisemiquinone bound in different environments in isolated succinate cytochrome *c* reductase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 3278-3284.
- Ostermeier, C. & Michel, H. (1997) Crystallization of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 697-701.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X. & Dutton, P.L. (1999) Natural Engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52.
- Palmer, G (1978) Complex III from baker's yeast. *Methods Enzym.* **53**, 113-121.
- Parrish, J.C., Guillemette, J.G. & Wallace, C.J.A. (2001) A tale of two charges: Distinct roles for an acidic and a basic amino acid in the structure and function of cytochrome *c*. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 83-91.
- Pelletier, H. & Kraut, J. (1992) Crystal Structure of a Complex Between Electron Transfer Partners, Cytochrome *c* Peroxidase and Cytochrome *c*. *Science* **258**, 1748-1755.
- Pettigrew, G.W. & Moore, G.R. (1987) Cytochromes *c*: Biological Aspects. *Springer Series in Molecular Biology, Springer Verlag, Berlin*.
- Poulos, T.L., Sheriff, S. & Howard, A.J. (1987) Cocrystals of Yeast Cytochrome Peroxidase and Horse Heart Cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **262**, 13881-13884.
- Rich, P. (1984) Electron and proton transfer through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 53-79.

- Rieder, R. & Bosshard, H.R. (1980) Comparison of the binding sites on cytochrome *c* for cytochrome *c* oxidase, cytochrome *bc*₁, and cytochrome *c*₁. *J. Biol. Chem.* **255** 4732-4739.
- Robinson, N.C., Zborowski, J. & Talbert, L.H. (1990) Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome *c* oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry*, **29**, 8962-8969.
- Rosa de la, F.F. & Palmer, G. (1983) Reductive titration of CoQ-depleted Complex III from Baker's yeast. Evidence for an exchange-coupled complex between QH• and low-spin ferricytochrome *b*. *FEBS Lett.* **163**, 140-143.
- Salerno, J.C., Osgood, M., Liu, Y., Taylor, H. & Scholes, C.P. (1990) Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) of the Q_C[•] Ubisemiquinone Radical in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Biochemistry* **29**, 6987-6993.
- Saraste, M. (1999) Oxidative Phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* **283**, 1488-1493.
- Schägger, H., Hagen, T., Roth, B., Brandt, U., Link, T. A. & von Jagow, G. (1990) Phospholipid specificity of bovine heart *bc*₁ complex. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 123-130
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000) Superkomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777-1783.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I, II, III, IV and V in bovine heart mitochondria, and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.*
- Schägger, H., Link, T.A., Engel, W. D. & von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven subunits of the *bc*₁ complex from beef heart. *Methods Enzymol.*, **126**, 224-237.
- Schlame, M., Brody, S. & Hosteler, K.Y. (1993) Mitochondrial cardiolipin in diverse eucaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur. J. Biochem.* **212**, 727-735.
- Schlame, M., Rua, D. & Greenberg M.L. (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **39**, 257-88.

- Schmitt, M. E. & Trumpower, B.L. (1990) Subunit 6 Regulates Half-of-the-sites Reactivity of the Dimeric Cytochrome *bc*₁ Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 17005-17011.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstädt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F.T. & Kohlwein, S.D. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **146**, 741-754.
- Schoppink, P.J., Hemrika, W., Reynen, J.M., Grivell, L.A. & Berden, J.A. (1988) Yeast ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase is still active after inactivation of the gene encoding the 17-kDa subunit VI. *Eur. J. Biochem.* **173**, 115-122.
- Schutz, M., Brugna, M., Lebrun, E., Baymann, F., Huber, R., Stetter, K.O., Hauska, G., Toci, R., Lemesle-Meunier, D., Tron, P., Schmidt, C. & Nitschke, W. (2000) Early evolution of cytochrome *bc* complexes. *J. Mol. Biol.* **300**, 663-675.
- Sherman, W.R., Ackerman, K.E., Bateman, R.H., Green, B.N. & Lewis, I. (1985) Mass-analysed ionkinetic energy spectra and B₁E-B₂ triple sector mass spectrometric analysis of phosphoinositides by fast atom bombardment. *Biomed. Mass Spectrom.* **12**, 409-413.
- Siedow, J.N., Power, S., de la Rosa, F.F. & Palmer, G. (1978) The preparation and characterization of highly purified, enzymically active complex III from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* **253**, 2392-2399
- Snyder, C.H. & Trumpower B.L. (1999) Ubiquinone at Center N Is Responsible for Triphasic Reduction of Cytochrome *b* in the Cytochrome *bc*₁ Complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 31209-31216.
- Snyder, C.H., Gutierrez-Cirlos, E.B. & Trumpower, B.L. (2000) Evidence for a Concerted Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the Cytochrome *bc*₁ Complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 13535-13541.
- Speck, S.H. & Margoliash, E. (1984) Characterization of the Interaction of Cytochrome *c* and Mitochondrial Ubiquinol-cytochrome *c* Reductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 1064-1072.

- Stonehuerner, J., O'Brien, P., Geren, L., Millet, F., Steidl, J., Yu, L. & Yu, C.-A. (1985) Identification of the Binding Site on Cytochrome c_1 for Cytochrome c . *J. Biol. Chem.* **260**, 5392-5398.
- Swanson, R., Trus, B.L., Mandel, N., Mandel, G., Kallai, O.B. & Dickerson, R.E. (1977) Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution: Ferricytochrome c structure analysis. *J. Biol. Chem.* **252**, 759-775.
- Taylor, A.B., Smith, B.S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. & Deisenhofer, J. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* **9**, 615-625.
- Tetreault, M., Rongey, S.H., Feher, G. & Okamura, M.Y. (2001) Interaction between Cytochrome c_2 and the Photosynthetic Reaction Center from *Rhodobacter sphaeroides*: Effects of Charge-Modifying Mutations on Binding and Electron Transfer. *Biochemistry* **40**, 8452-8462.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**, 4673-4680.
- Tian, H., Sadoski, R., Zhang, L., Yu, C.-A., Yu, L., Durham, B. & Millet, F. (2000) Definition of the Interaction Domain for Cytochrome c on the Cytochrome bc_1 Complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 9587-9595.
- Tiede, D.M., Vashishta, A.-C. & Gunner, M.R. (1993) Electron-Transfer Kinetics and Electrostatic Properties of the *Rhodobacter sphaeroides* Reaction Center and Soluble c -Cytochromes. *Biochemistry* **32**, 4515-4531.
- Tisdale, H.D. (1967) Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase (complex II-III). *Methods Enzymol.* **10**, 213-216.
- Trumpower, B. L. (1990) The protonmotive Q cycle: Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 11409-11412.
- Trumpower, B.L. & Gennis, R.B. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron

- transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 675-716.
- T'sai, A. & Palmer, G. (1983) Potentiometric studies on yeast complex III. *Biochim. Biophys. Acta* **722**, 349-363.
- T'sai, A.L. & Palmer, G. (1985) The role of phospholipids in the binding of antimycin to yeast Complex III. *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 100-105.
- T'sai, A.L., Kauten, R. & Palmer, G. (1985) Interaction of yeast complex III with some respiratory inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **806**, 418-426.
- Ubbink, M., Ejdebäck, M., Karlsson, B.G. & Bendall, D. S. (1998) The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome *f*, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid body molecular dynamics. *Structure* **6**, 323-335 .
- Wakeham, M.C., Sessions, R.B., Jones, M.R. & Fyfe P.K. (2001) Is There a Conserved Interaction between Cardiolipin and the Type II Bacterial Reaction Center ? *Biophys. J.* **80**, 1395-1405.
- Watkins, J.A., Cusanovich, M.A., Meyer, T.E. & Tollin, G. (1994) A "parallel plate" electrostatic model for bimolecular rate constants applied to electron transfer proteins. *Protein Science* **3**, 2104-2114.
- Wingfield, P., Arad, T., Leonard, K. & Weiss, H. (1979) Membrane crystals of ubiquinone:cytochrome *c* reductase from *Neurospora* mitochondria. *Nature* **280**, 696-697.
- Wuttke, D.S., Bjerrum, M.J., Winkler, J.R. & Gray, H.B. (1992) Electron-Tunneling Pathways in Cytochrome *c*. *Science* **256**, 1007-1009.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. & Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc₁* complex from bovine heart mitochondria. *Science*, **277**, 60-66.
- Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gawrisch, K. & White, S.H. (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, **37**, 14713-14718.
- Yu, C.-A. & Yu, L. (1980) Structural role of phospholipids in ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *Biochemistry*, **19**, 5715-5720

- Yu, C.-A., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Yu, L., Xia, D., Kim, H. & Deisenhofer, J. (1996) Crystallization and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome-*bc*₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 47-53.
- Zhang, Z.L., Huang, L.S., Shulmeister, V.M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R. Berry, E.A. & Kim, S.H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*₁. *Nature*, **392**, 677-684.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.-V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., Daum, G. (1998) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, **173**, 2026-2034.

[illegible]

QCR9 (Untereinheit 9):

HUMAN	-	-	-	-	-	-	A	A	A	T	L	T	S	K	L	Y	S	L	L	F	R	R	T	S	T	F
BOVIN	-	-	-	-	-	-	V	A	P	T	L	T	A	R	L	Y	S	L	L	F	R	R	T	S	T	F
DROME	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	V	I	Y	N	T	L	F	K	R	T	S	T	Y
SOLTU	M	E	S	A	A	R	R	S	G	G	V	L	E	G	F	Y	R	L	V	M	R	R	T	P	V	Y
SCHPO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	A	S	S	T	I	Y	N	I	F	F	R	R	N	S	S	F
YEAST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	F	S	S	L		Y	K	T	F	F	K	R	N	A	V	F
										1										10						

HUMAN	A	L	T	I	I	V	G	V	M	F	F	E	R	A	F	D	Q	G	A	D	A	I	Y	D	H	I	N
BOVIN	A	L	T	I	V	V	G	A	L	F	F	E	R	A	F	D	Q	G	A	D	A	I	Y	D	H	I	N
DROME	A	V	A	I	I	A	S	A	F	F	F	E	R	A	L	D	V	T	S	V	A	I	F	E	G	I	N
SOLTU	V	T	F	V	I	A	G	A	L	L	G	E	R	A	V	D	Y	G	V	K	T	L	W	E	K	N	N
SCHPO	Y	A	T	I	I	F	V	S	A	F	F	A	K	I	G	D	V	F	T	D	S	V	W	K	R	A	N
YEAST	V	G	T	I	F	A	G	A	F	V	F	Q	T	V	F	D	T	A	I	T	S	W	Y	E	N	H	N
				20										30								40					

HUMAN	E	G	K	L	W	K	H	I	K	H	K	Y	E	N	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOVIN	E	G	K	L	W	K	H	I	K	H	K	Y	E	N	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DROME	K	G	K	L	W	K	D	I	K	G	K	Y	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOLTU	V	G	K	R	Y	E	D	I	S	V	L	G	Q	R	P	V	D	E	-	-	-	-	-	-	-
SCHPO	A	G	L	T	W	D	E	V	K	P	R	F	L	N	K	D	E	D	A	E	D	D	E	-	-
YEAST	K	G	K	L	W	K	D	V	K	A	R	I	A	A	G	D	G	D	D	-	D	D	E	-	-
						50														60					

Danksagung

Dr. Carola Hunte danke ich für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit und für wertvolle Diskussionen, die für den Erfolg der Arbeit entscheidend waren.

Prof. Dr. Hartmut Michel danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine kontinuierliche Unterstützung.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Den Kollegen der Gruppe von Dr. Carola Hunte, insbesondere **Dr. Miro Venturi, Tina Wenz, Hildur Palsdottir, Nils Hanekop** sowie **Heidi Müller** danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Daniela Vinzenz danke ich für ihre gute Zusammenarbeit und die Präparation des Antikörperfragments für Kristallisationsexperimente.

Dr. Robert Graf vom MPI für Polymerforschung Mainz danke ich für die Messung der NMR-Spektren der Proteinproben.

Stephane Grimaldi und **Dr. Fraser McMillan** danke ich für ihr Interesse und ihre EPR-Messungen am Ubisemichinon in den Proteinproben.

Dr. Wolfgang Grabarse danke ich für seine Unterstützung beim Arbeiten mit kristallographischer Software und seine kritischen Diskussionen.

Prof. Dr. Michael Karas und **Ralf Krüger** danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der Phospholipide aus Proteinproben mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie.

Daniel Ungar danke ich für sein Interesse an der Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie.

Manfred Nachtwey danke ich für die aufwendige Herstellung der Rotoreninserts für die NMR-Spektroskopie und die stetige Hilfe bei der Behebung von Defekten an Gerätschaften.

Hiltrun Müller und **Rosemarie Kolb** danke ich für ihre kontinuierliche Unterstützung beim Finden der benötigten Literatur.

Barbara Schiller danke ich für ihre Hilfe beim Beheben von Hardware und Softwareproblemen.

Cornelia Münke und **Hannelore Müller** danke ich für die Bereitstellung von Ultrafiltrationseinheiten und Detergens.

Eva Molsberger danke ich nicht nur für ihre Hilfe bei der Kultivierung von Hefestämmen.

Björn Mamat danke ich für die gute Unterstützung während des Schreibens der Doktorarbeit.

Allen nicht genannten **Personen der Abteilung Molekulare Membranbiologie** danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Name	Christian Lange
Geburtsdatum	30.03.1972
Geburtsort	Winterberg

Schulbildung

1978-1982	Grundschule in Winterberg-Züschchen
1982-1988	Städtische Realschule in Olsberg
1988-1991	Höhere Berufsfachschule für Technik in Olsberg mit Berufsausbildung zum Staatlich geprüften Chemisch-technischen Assistenten und Fachhochschulreife

1991-1992	Grundwehrdienst
-----------	-----------------

Studium

1992-1995	Studium der Chemie an der Universität- Gesamthochschule in Siegen
1995	Vordiplom
1995-1997	Hauptstudium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
1997-1998	Diplomarbeit am Scripps Research Institute in La Jolla, USA bei Prof. Dr. Reza M. Ghadiri zum Thema "Self- assembly nanostructures of cyclic peptide dimers in DPPC monolayers"
1998	Diplom

Dissertation

seit 1998	Doktorarbeit zum Thema "Wechselwirkungen des Cytochrom- <i>bc</i> ₁ - Komplexes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit seinen Substraten Cytochrom <i>c</i> und Ubichinon sowie mit Membranlipiden" bei Dr. Carola Hunte in der Abteilung für Molekulare Membranbiologie des Max-Planck-Instituts für Biophysik in Frankfurt am Main
-----------	--